



TESIS DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Anticuerpos monodominio fusionados a la luciferasa NanoLuc para el diagnóstico de enfermedades infecciosas y alergias

Paula Segovia de los Santos

Tutor: Dr. Gualberto González-Sapienza

Co-tutor: Dr. Gabriel Lassabe

Área Inmunología, Facultad de Química, Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Febrero, 2024

AGRADECIMIENTOS

Llevar adelante esta tesis de maestría no hubiera sido posible sin el apoyo, tanto a nivel profesional como personal, de quienes me rodean. Me siento muy afortunada de haber transitado este camino junto a las personas a quienes ahora quiero agradecer.

A mi tutor, Gualberto, por recibirme en el laboratorio y acompañar cada paso del desarrollo de la tesis. Por su gran dedicación, sus enseñanzas y su contagioso entusiasmo por la ciencia; por brindarme tantas horas para discutir ideas y motivarme a cada paso durante estos años.

A mi co-tutor, Gabriel, por sus enseñanzas, su apoyo día a día, su enorme dedicación y paciencia inagotable. Por las largas discusiones de resultados y por darme ánimo cuando lo necesité.

A los miembros del tribunal evaluador, Natalia Olivero, Caterina Rufo y Agustín Correa, por aceptar corregir este trabajo.

A todos los integrantes de la Cátedra de Inmunología, por crear un hermoso ambiente de trabajo y estar siempre dispuestos a brindar ayuda. Agradezco especialmente a los integrantes de la Casita del Fondo por su compañerismo y sus consejos: los días buenos en el laboratorio son aún mejores con ustedes, y los malos son superados mucho más fácilmente.

A mis padres y hermana, por su apoyo incondicional de toda la vida, por sus consejos, por alentar mi decisión de seguir este camino y acompañarme cuando más los necesité.

A mis amigas de siempre, por su apoyo incondicional, sus ganas de escucharme, y porque su dedicación al perseguir sus metas continúa inspirándome día a día.

¡Gracias! <3

RESUMEN

En esta tesis se exploró el potencial de generar proteínas quiméricas, formadas por nanobodies unidos a la enzima NanoLuc, para su uso como reactivos de detección en inmunoensayos. NanoLuc deriva de una luciferasa obtenida del camarón *Oplophorus gracilirostris*, que fue optimizada para su uso en aplicaciones biotecnológicas. La enzima resultante es de pequeño tamaño (19 kDa) y se destaca por generar mayores niveles de señal, además de poseer una buena estabilidad y presentar un alto nivel de expresión en *Escherichia coli*. Por estos motivos, resultó atractivo explorar su uso como estrategia para potenciar la sensibilidad de inmunoensayos.

Inicialmente, utilizando un nanobody modelo se puso a punto la metodología para la producción y medición de actividad de las quimeras. Seguidamente, se aplicó esta estrategia al desarrollo de un inmunoensayo para la detección de la proteína de nucleocápside (proteína N) del virus SARS-CoV-2, el principal antígeno utilizado en el diagnóstico de esta infección. Esto incluyó la selección de un par optimizado de nanobodies contra esta proteína, los cuales fueron implementados en un ELISA en formato sándwich para la detección del antígeno en muestras de hisopado nasofaríngeo. El test desarrollado mostró una excelente especificidad y una muy alta sensibilidad. En comparación con el formato colorimétrico, la quimera nanobody-NanoLuc mostró ser un importante factor para lograr un sustancial aumento de la sensibilidad diagnóstica.

Dada la capacidad reportera intrínseca de las quimeras, se pasó luego a utilizarlas como método de screening masivo de nanobodies. Como modelo, se utilizó la detección de la IgE humana, cuya cuantificación en suero posee gran relevancia a nivel clínico. Luego de la selección de un nanobody de alta afinidad para la captura, se utilizó el inmunocomplejo entre este nanobody y la IgE para aislar mediante panning potenciales nanobodies de detección. Los genes de los nanobodies seleccionados se combinaron en masa con el gen de NanoLuc, dando lugar a una biblioteca de expresión de quimeras que se usó para seleccionar, empíricamente y en gran escala, los nanobodies de detección en su formato final. Esta estrategia mostró un gran potencial, y dio lugar a la selección de seis clones de alta afinidad capaces de detectar la IgE humana con alta sensibilidad. Sin embargo, debido a la sobre-representación de nanobodies de alta afinidad, la biblioteca anti-IgE utilizada no resultó óptima como modelo para la evaluación del nuevo método de screening.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	ii
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Inmunoensayos: métodos rápidos y sencillos de diagnóstico	3
2. Luciferasas y sus ventajas como enzimas reporteras en inmunoensayos	4
2.1 NanoLuc.....	7
3. Nanobodies y su aplicación en inmunodetección.....	8
3.1 Anticuerpos de cadena pesada	8
3.2 Nanobodies	11
3.3 Selección de nanobodies.....	13
3.4 Phage Display	15
4. La infección por el virus SARS-CoV-2 y su diagnóstico mediante tests de antígeno.....	17
4.1 Diagnóstico de infección por SARS-CoV-2.....	20
5. Detección de IgE humana.....	21
OBJETIVOS	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Protocolos generales.....	24
1.1 Cultivo de Escherichia coli.....	24
1.2 Transformación	24
1.3 Extracción de ADN plasmídico, secuenciación y análisis de secuencias	24
1.4 ELISA	24
1.5 PCR	25
1.6 Cuantificación de ADN y proteínas.....	25
1.7 Electroforesis SDS-PAGE.....	25
1.8 Electroforesis en gel de agarosa.....	25
1.9 Análisis de datos y generación de imágenes.....	26

2. Vectores utilizados para la expresión de nanobodies.....	26
2.1 Vector pComb3X	26
2.2 Vectores pINQ	26
2.3 pcDNA3.1(+)	27
3. Subclonado de nanobodies	27
4. Caracterización de la quimera NbA2-NanoLuc	28
4.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	28
4.2 Titulación del NbA2 anti-microcistina	28
4.3 ELISA de competencia para la detección de microcistina	29
5. Ensayo de actividad enzimática NanoLuc	29
6. Producción recombinante de proteína N.....	29
7. Inmunización de una llama y construcción de bibliotecas de fagos filamentosos	30
7.1 Titulación de anticuerpos de cadena pesada en sueros de llama.....	31
8. Selección de nanobodies mediante panning	31
8.1 Amplificación de fagos	32
8.2 Titulación de fagos	33
8.3 Screening preliminar del output de fagos	33
8.4 Obtención del vector fagémido a partir de un output de fagos	34
9. Expresión recombinante de nanobodies.....	34
9.1 Expresión high-throughput y screening de nanobodies	34
9.2 Expresión recombinante de nanobodies seleccionados en <i>E. coli</i>	34
9.2.1 Screening de condiciones de re-plegamiento de la quimera NbON10-NanoLuc	35
9.3 Expresión recombinante de la quimera NbON10-NanoLuc en células HEK293T.....	36
10. Determinación de constantes de afinidad (K_D) y binning de epítopes de nanobodies.	36
11. ELISA en formato sándwich para la detección de proteína N e IgE	37
11.1 Muestras clínicas analizadas	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Capítulo 1: Exploración del uso de NanoLuc como enzima reportera fusionada a un nanobody modelo anti-microcistina	39
1.1 Expresión recombinante de NbA2-NanoLuc	39
1.2 Evaluación de la funcionalidad de la quimera producida	42
Capítulo 2: Desarrollo de un inmunoensayo para la detección de proteína N de SARS-CoV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo	46
2.1 Selección de nanobodies anti-proteína N	46

2.1.1 Expresión recombinante de proteína N	46
2.1.2 Inmunización de una llama y construcción de la biblioteca de Phage Display	47
2.1.3 Selección de nanobodies contra la proteína N	48
2.1.4 Caracterización de los tres nanobodies seleccionados mediante interferometría de biocapa	55
2.2 Desarrollo de un ELISA colorimétrico para la detección de proteína N	56
2.2.1 Optimización de las condiciones del ensayo	56
2.2.2 Detección de proteína N en muestras de hisopado nasofaríngeo	59
2.3 Adaptación del ensayo a un formato luminiscente mediante el uso de una quimera nanobody-NanoLuc	61
2.3.1 Expresión recombinante de la quimera NbON10-NanoLuc	62
2.3.2 Evaluación analítica del ELISA luminiscente	65
2.3.3 Determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo luminiscente	66
2.3.4 Efectividad del ensayo en la detección de variantes de SARS-CoV-2	69
Capítulo 3: Exploración de un método de screening masivo de nanobodies utilizando bibliotecas de quimeras nanobody-NanoLuc	71
3.1 Inmunización de una llama y construcción de la biblioteca de Phage Display	73
3.2 Selección del nanobody de captura	74
3.3 Exploración de un método de screening masivo para la selección empírica de nanobodies de detección	78
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	91
REFERENCIAS	93

ABREVIATURAS

6xHis	Cola de 6 histidinas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	Del inglés: <i>Bovine Serum Albumin</i> (seroalbúmina bovina)
CDR	Del inglés: <i>Complementarity-Determining Region</i> (región determinante de la complementariedad)
CH1, CH2, CH3	Dominios constantes de anticuerpos
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DO	Densidad Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Del inglés: <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas)
Fc	Fragmento cristalizante
FR	Del inglés: <i>Framework Region</i>
HA	Epítotope de hemaglutinina
HcAbs	Del inglés: <i>Heavy chain Antibodies</i> (anticuerpos de cadena pesada)
IC	Intervalo de confianza
Ig	Inmunoglobulina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani <i>broth</i>
MALDI-TOF	Del inglés: <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (desorción/ionización láser asistida por matriz) y <i>Time-Of-Flight</i> (tiempo de vuelo)

Ni-NTA	Del inglés: <i>Nickel-Nitrilotriacetic Acid</i> (Niquel-ácido nitrilotriacético)
OmpA	Del inglés: <i>Outer membrane protein A</i>
ON	Del inglés: <i>overnight</i> (equivale a 16-20 horas)
pb	Pares de bases
PBS	Del inglés: <i>phosphate buffered saline</i> (buffer fosfato salino)
PCR	Del inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
PMSF	Del inglés: <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
ROC	Del inglés: <i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica Operativa del Receptor)
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Del inglés: <i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> (retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
scFv	Del inglés: <i>Single-chain variable fragment</i> (fragmento variable de cadena única)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
TB	<i>Terrific Broth</i>
TFA	Del inglés: <i>trifluoroacetic acid</i> (ácido trifluoroacético)
UA	Unidades de absorbancia
ufc	Unidades formadoras de colonias
URL	Unidades relativas de luminiscencia
UV	Ultravioleta
VH	Dominio variable de la cadena pesada de anticuerpos convencionales
VHH	Dominio variable de anticuerpos de cadena pesada de camélidos
VL	Dominio variable de la cadena liviana

INTRODUCCIÓN

1. Inmunoensayos: métodos rápidos y sencillos de diagnóstico

Los inmunoensayos son técnicas analíticas basadas en la formación de complejos antígeno-anticuerpo, utilizando diversos sistemas para la detección de estos complejos. Debido a la alta afinidad y especificidad que caracteriza esta interacción, los anticuerpos constituyen potentes herramientas analíticas que facilitan el desarrollo de ensayos de alta sensibilidad y especificidad. Además, los inmunoensayos generalmente permiten el análisis de múltiples muestras en simultáneo (high-throughput). Por estas razones, son muy utilizados en áreas como el diagnóstico clínico y monitoreo ambiental.

El primer inmunoensayo, un radioinmunoensayo (RIA) para la cuantificación de insulina humana, fue reportado por Berson y Yalow en 1959[1]. Se trataba de un ensayo competitivo basado en el uso de un suero anti-insulina como fuente de anticuerpos, junto con una preparación de insulina marcada radiactivamente con ^{131}I . En el ensayo, realizado en fase líquida, se establecía una competencia por la unión a los anticuerpos entre la insulina- ^{131}I y la insulina presente en las muestras de sueros de pacientes. Luego de la separación de la insulina libre y los inmunocomplejos por métodos cromatográficos, la cuantificación de insulina- ^{131}I en ambas fracciones permitía calcular la concentración de insulina en las muestras.

El campo de los inmunoensayos ha crecido y se ha desarrollado ampliamente desde entonces. Uno de los avances claves fue el desarrollo del ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)[2], que combina el uso de anticuerpos o antígenos inmovilizados sobre una fase sólida con el uso de antígenos o anticuerpos ligados a enzimas reporteras para el revelado de la formación de inmunocomplejos. El uso de reacciones enzimáticas en lugar de radiactividad como herramienta de detección resultó en ensayos más seguros y menos costosos.

Debido a su simpleza, bajo costo y alta sensibilidad, el ensayo ELISA continúa siendo ampliamente utilizado en la actualidad, y con el tiempo ha dado lugar a un gran número de variantes y adaptaciones. Un avance importante en este campo se produjo con la introducción de la tecnología para la producción de anticuerpos monoclonales[3], que permitió el desarrollo de ensayos de mayor especificidad y reproducibilidad, contribuyendo a la estandarización. Por otra parte, la generación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos recombinantes, como los fragmentos variables de cadena única (scFv) o los anticuerpos monodominio, simplificó la producción de los reactivos de inmunodetección y dio lugar a la posibilidad de generar fusiones génicas con proteínas de detección.

La peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina fueron las dos primeras enzimas utilizadas en ensayos ELISA, y continúan siendo las más frecuentemente empleadas en la actualidad[4]. Estas enzimas comúnmente son conjugadas a antígenos y anticuerpos utilizando protocolos de conjugación química. Los tipos de señal producidos dependen de los sustratos que se utilicen,

pudiendo dar lugar a la formación de productos coloreados o fluorescentes, o a la emisión de luz en forma concomitante a la reacción (quimioluminiscencia).

Los principales determinantes de la sensibilidad de un inmunoensayo son la afinidad de los anticuerpos utilizados y la sensibilidad del sistema de detección. Con el objetivo de alcanzar sensibilidades superiores, se han desarrollado un gran número de sistemas de detección alternativos a las enzimas tradicionalmente utilizadas, como por ejemplo el uso de reacciones electroquímicas[5] o reacciones de amplificación de ácidos nucleicos[6, 7]. En cuanto al uso de enzimas reporteras alternativas, un área de gran interés concierne el uso de luciferasas, las enzimas responsables del fenómeno de bioluminiscencia[8, 9].

2. Luciferasas y sus ventajas como enzimas reporteras en inmunoensayos

El fenómeno de producción de luz visible por parte de organismos vivos, denominado bioluminiscencia, se ha observado en organismos muy diversos, incluyendo bacterias, hongos y animales[10]. En estos últimos, cumple funciones relacionadas a la defensa, apareamiento y evasión de depredadores.

Uno de los ejemplos más conocidos de bioluminiscencia son las luciérnagas, que son capaces de emitir luz amarilla-verde como mecanismo de comunicación y atracción de parejas reproductoras[11]. Sin embargo, este fenómeno presenta la más alta prevalencia en las profundidades del océano, donde la luz solar es escasa. Allí, la mayoría de los animales han evolucionado para la emisión de luz azul, correspondiente a las longitudes de onda que pueden transmitirse por mayores distancias en el océano[10]. En algunos casos, la emisión de luz de estos animales proviene de bacterias bioluminiscentes con las que establecen relaciones simbióticas, mientras que en otros los mecanismos de producción de luz son propios del animal.

En casi todos los ejemplos conocidos la producción de luz depende de enzimas denominadas luciferasas, que catalizan la oxidación con oxígeno molecular de una pequeña molécula orgánica conocida como luciferina (un nombre genérico que engloba diversas especies químicas que pueden ser sustratos de estas enzimas, siendo cada luciferasa específica por una luciferina en particular). El producto de esta reacción es la oxiluciferina en estado excitado, cuya transición al estado basal resulta en la emisión de luz visible[12]. A pesar de que la emisión de luz se produce a través de este mecanismo común, las luciferasas a menudo no presentan homología entre diferentes taxa, y las luciferinas utilizadas por estas enzimas son estructuralmente muy diversas[13, 14] (**figura 1**). Se estima que la bioluminiscencia ha evolucionado al menos 40 veces entre especies actuales, aunque se trata de un campo en el que todavía queda mucho por explorar y es probable que el número real sea aún mayor[15].

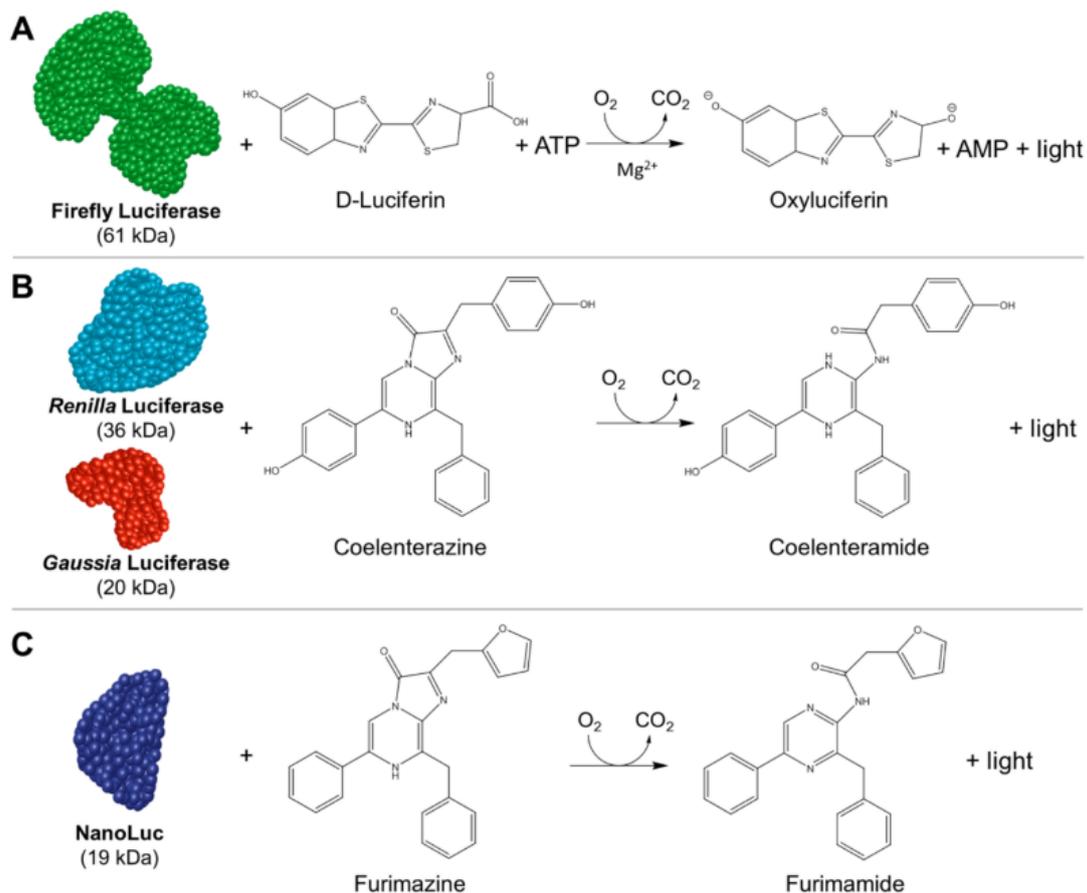


Figura 1 | Reacciones catalizadas por algunas de las luciferasas más utilizadas. Todas ellas catalizan la oxidación con oxígeno molecular de una luciferina, dando lugar a un producto oxidado con la concomitante emisión de luz. (A) *Firefly luciferase* (FLuc) cataliza la oxidación de D-luciferina en presencia de ATP y Mg^{2+} , dando lugar a oxiluciferina. (B) *Renilla luciferase* (RLuc) y *Gaussia luciferase* (GLuc) catalizan la oxidación de coelenteracina, dando lugar a coelenteramida. (C) NanoLuc cataliza la oxidación de furimazina, dando lugar al producto oxidado furimamida. Imagen obtenida de England, C. G. *et al*; 2016[16].

A pesar de la diversidad de luciferasas encontrada en la naturaleza, hasta el momento solo se han identificado aproximadamente una decena de luciferasas no relacionadas entre sí[14]. La primera luciferasa en ser clonada y expresada en forma recombinante fue la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*, en 1987[17]. Esta luciferasa, conocida como FLuc, posee una masa molecular de 62 kDa. Su sustrato es la D-luciferina, y depende de ATP y Mg^{2+} para su actividad[18]. Inicialmente, FLuc fue utilizada como proteína reportera para estudiar la actividad de promotores[17], y desde entonces su espectro de aplicaciones, junto a otras luciferasas posteriormente caracterizadas, ha continuado expandiéndose.

Como proteínas reporteras, las luciferasas se destacan sobre otros sistemas por su alta sensibilidad, amplio rango dinámico y simpleza de aplicación[10]. En contraste con otros sistemas de alta sensibilidad como la fluorescencia, la bioluminiscencia no requiere luz de excitación, lo cual permite alcanzar una mayor relación señal/ruido. Esto se debe tanto a la

ausencia de interferencia de la luz de excitación como a la ausencia de emisión por fluorescencia de otros componentes presentes en los ensayos[19].

Las luciferasas han sido utilizadas ampliamente en ensayos *in vitro* e *in vivo*, como ensayos de expresión génica, screening de alto rendimiento para el descubrimiento de fármacos e imagenología de organismos vivos, incluyendo estudios de desarrollo de cáncer y seguimiento de enfermedades infecciosas[12]. Asimismo, han sido aplicadas a diversos ensayos analíticos, destacándose los ensayos de cuantificación de ATP basados en luciferasas que utilizan esta molécula como sustrato, los cuales son utilizados en monitoreo de alimentos y monitoreo ambiental. Por otra parte, el acoplamiento de luciferasas a moléculas de reconocimiento permite su utilización como enzimas reporteras en inmunoensayos[20].

En la actualidad, las luciferasas más comúnmente empleadas para la mayoría de estas aplicaciones son FLuc y RLuc. Esta última fue obtenida del coral blando *Renilla reniformis*, y se trata de una proteína de 34 kDa cuyo sustrato es la coelenteracina[18]. Este sustrato es utilizado por la mayoría de las luciferasas marinas conocidas, y su oxidación da lugar al producto coelenteramida con la concomitante emisión de luz azul[21].

Otra luciferasa marina muy utilizada es GLuc. Derivada del pequeño crustáceo *Gaussia princeps*, se destacó inicialmente por su pequeño tamaño (20 kDa), alta intensidad de luminiscencia y alta estabilidad. Sin embargo, el rápido decaimiento de la señal producida por esta luciferasa ha limitado su uso en ciertas aplicaciones[22].

Las diferentes luciferasas presentan distintas ventajas y limitaciones, en función del tipo de ensayo en que sean utilizadas. Por ejemplo, las luciferasas marinas productoras de luz azul generalmente no son adecuadas para aplicaciones *in vivo* en mamíferos, dado que estas longitudes de onda son absorbidas por la hemoglobina y otros cromóforos, como la melanina[10, 23]. Otros aspectos que pueden resultar limitantes para la aplicación de ciertas luciferasas son una baja termoestabilidad, cinética enzimática limitante, susceptibilidad a inhibidores y el hecho de que algunas luciferinas presentan citotoxicidad[20].

La modificación tanto de luciferasas como luciferinas ha sido utilizada para vencer estas limitaciones. Se han desarrollado un gran número de sustratos alternativos y versiones mutadas de las distintas luciferasas, que permiten obtener sistemas mejorados en los distintos aspectos mencionados anteriormente. A modo de ejemplo, Loening *et al* han desarrollado diferentes variantes de RLuc. La primera de ellas, RLuc8[24], presentó una estabilidad superior *in vivo* y un aumento de 4 veces en la señal generada con respecto a la enzima *wild type*. A partir de esta proteína, posteriormente desarrollaron una variante más propicia para aplicaciones en imagenología *in vivo*, con un espectro de emisión corrido hacia el rojo 45 nm con respecto a la enzima *wild type* y una mayor estabilidad al ser inyectada en ratones[25]. El uso de sustratos alternativos, como la coelenteracina-v, permitió observar un corrimiento hacia el rojo aún mayor para esta variante.

Por otra parte, la enzima GLuc también ha sido blanco de esfuerzos de optimización, en particular para abordar el rápido decaimiento de su señal luminiscente. Con este propósito, se ha logrado generar variantes cuya luminiscencia presenta una vida media de varios minutos, aunque la señal producida por estas variantes es significativamente menor[19, 26].

En paralelo, el objetivo de ampliar y mejorar las capacidades de los sistemas bioluminiscentes condujo al descubrimiento de nuevas luciferasas. La luciferasa del camarón *Oplophorus gracilirostris* fue clonada por primera vez en el año 2000, revelando que se trataba de una proteína heterotetramérica formada por dos pares de subunidades idénticas de 19 y 35 kDa[27]. La expresión de estas subunidades permitió determinar que la actividad luciferasa se localizaba exclusivamente en la subunidad de 19 kDa (OLuc-19), mientras que la subunidad de 35 kDa parece contribuir a la estabilización de la proteína, que es secretada por *O. gracilirostris*. Al igual que muchas de las luciferasas marinas, su sustrato natural es la coelenteracina, cuya oxidación es catalizada en ausencia de cofactores dando lugar a la emisión de luz azul. Si bien el pequeño tamaño y naturaleza monomérica de OLuc-19 la volvían una alternativa atractiva a otras luciferasas conocidas, su baja estabilidad resultaba limitante para su aplicación.

En 2012, Hall *et al* utilizaron OLuc-19 como punto de partida para generar una luciferasa con propiedades más favorables para su aplicación biotecnológica[28]. Realizaron para ello tres rondas de mutagénesis y selección, combinando mutagénesis dirigida y aleatoria, con el fin de obtener una enzima que produjera una intensidad de señal superior, y presentara mayor estabilidad y nivel de expresión en *E. coli*. Asimismo, sintetizaron y evaluaron análogos de coelenteracina en búsqueda de un sustrato más estable que contribuyera a maximizar la señal generada. La enzima seleccionada mediante este proceso se denominó NanoLuc, presenta 16 sustituciones de aminoácidos y tiene a la furimazina como sustrato óptimo (**figura 1**). Su pico de emisión, ubicado en 460 nm, resulta prácticamente incambiado con respecto a OLuc-19. En conjunto, el sistema NanoLuc/furimazina presentó una señal luminiscente 2,5 millones de veces mayor a OLuc-19/coelenteracina[28].

2.1 NanoLuc

NanoLuc posee diversas ventajas importantes como enzima reportera en comparación con otras luciferasas. En primer lugar, se destaca por la estabilidad de la señal luminiscente generada, con una vida media que puede exceder las dos horas. Además, NanoLuc produce una intensidad de luminiscencia aproximadamente 150 veces mayor que FLuc y RLuc, presenta una mayor estabilidad frente a altas temperaturas y agentes desnaturizantes, un más amplio rango de pH, y no requiere cofactores para su actividad[28]. En los últimos años, NanoLuc ha sido empleada como reportera en diversas aplicaciones típicas de las enzimas luciferasas, incluyendo el estudio de interacciones entre proteínas, procesos de regulación de expresión génica y señalización celular, estudios de estabilidad de proteínas e imagenología *in vivo*[16].

Además, ciertas características de NanoLuc como su pequeño tamaño, naturaleza monomérica y la ausencia de modificaciones postraduccionales, la posicionan como una herramienta ideal para la construcción de quimeras génicas destinadas a la generación de reactivos de inmunodetección. La producción de quimeras de este tipo simplifica la ejecución de los inmunoensayos al eliminar la necesidad de anticuerpos secundarios. Además, contribuye a mejorar la reproducibilidad de los ensayos, ya que estas construcciones permiten la unión entre anticuerpo y enzima con una estequiometría definida. Hasta el momento, el uso de NanoLuc para el desarrollo de inmunoensayos es un área que ha sido poco explorada, sin

embargo, en los casos en que se ha implementado ha posibilitado la obtención de ensayos de mayor sensibilidad en comparación con versiones colorimétricas o el uso de otras luciferasas.

Una de las primeras aplicaciones de esta enzima al desarrollo de inmunoensayos fue reportada en 2017, en la cual Nath *et al* desarrollaron un inmunoensayo en formato ELISA luminiscente para la detección de anticuerpos contra anticuerpos terapéuticos[29]. El ensayo involucró la generación de quimeras de anticuerpos convencionales con NanoLuc, que fueron expresadas en células HEK293. La metodología permitió obtener un ensayo de alta sensibilidad, aunque en este caso el mismo no es comparado a su contraparte tradicional.

Otro ejemplo fue reportado en 2019, en el cual Ren *et al* expresaron una quimera nanobody-NanoLuc para su aplicación en un ensayo ELISA de competencia para la detección de aflatoxina B₁, una micotoxina carcinógena cuyo contenido en alimentos debe ser monitoreado[30]. Este ensayo presentó un IC50 20 veces menor al ensayo colorimétrico previamente generado para la detección de esta toxina utilizando el mismo nanobody.

Por otra parte, en un estudio reportado por Oyama *et al* en 2021, se generó una quimera de fragmento variable de cadena única (scFv) con NanoLuc, que fue implementada en ensayos ELISA tanto de competencia como de captura para la detección de la hormona T4 o un conjugado T4-BSA respectivamente[31]. Con el fin de comparar este sistema a otros posibles sistemas de detección, se generaron además quimeras con la luciferasa GLuc. Para los ensayos tanto de competencia como captura, el uso de NanoLuc permitió la obtención de mayores sensibilidades. En particular, el ensayo de competencia utilizando la quimera de NanoLuc fue comparado además con una versión colorimétrica, obteniéndose un límite de detección 70 veces menor.

En 2022 se reportó por He *et al* otro trabajo donde se comparó el desempeño de un ensayo empleando quimeras scFv-NanoLuc con un ensayo colorimétrico tradicional[32]. El ensayo, un ELISA de captura para la detección del biomarcador serológico ferritina, presentó un límite de detección dos veces menor en el formato luminiscente, una mejora menos pronunciada que en los ensayos reportados anteriormente.

3. Nanobodies y su aplicación en inmunodetección

3.1 Anticuerpos de cadena pesada

Los anticuerpos típicos encontrados en todos los vertebrados mandibulados están constituidos por un par de cadenas pesadas idénticas y un par de cadenas livianas idénticas. Sin embargo, un evento evolutivo en el ancestro común de la familia *Camelidae* condujo al surgimiento de un tipo adicional de anticuerpos que carecen de cadenas livianas, denominados anticuerpos de cadena pesada (HcAbs)[33]. En la actualidad, esta familia está representada por el camello bactriano (*Camelus bactrianus*), camello salvaje (*Camelus ferus*) y dromedario (*Camelus dromedarius*), nativos de Europa y Asia; así como la vicuña (*Vicugna vicugna*), alpaca (*Vicugna pacos*), guanaco (*Lama guanicoe*) y llama (*Lama glama*), nativos de América del Sur.

Los HcAbs forman parte de la respuesta inmune normal de estos animales ante infecciones, representando un 25% de los anticuerpos circulantes en llamas[34] y un 80% en el caso de los camellos[35]. Estos anticuerpos pertenecen al isotipo IgG y, en función de su región Fc, pueden pertenecer a una de dos subclases exclusivas de los HcAbs, IgG2 e IgG3[33]. Recientemente se ha reportado además una subclase del isotipo IgA en dromedario que corresponde a HcAbs, aunque la evidencia disponible hasta el momento indica que esta subclase no estaría presente en otras especies de camélidos[36].

El reconocimiento de antígeno en HcAbs está mediado por dominios variables característicos denominados VHH. Los mismos se forman como resultado de reordenamientos durante la recombinación somática entre segmentos génicos V específicos para VHH dentro del locus de cadena pesada (locus IGH), y segmentos D y J que son comunes tanto para dominios VH como VHH[37, 38] (**figura 2**). Los aspectos moleculares del desarrollo del BCR, como la forma en que ocurre el cambio de clase hacia IgG2 e IgG3, aún no se conocen en detalle.

Cada monómero de los anticuerpos de cadena pesada está compuesto por el dominio VHH seguido de una región bisagra y los dominios CH2 y CH3. Estos anticuerpos no presentan el dominio CH1, que en anticuerpos convencionales es esencial para la asociación con la cadena liviana. Si bien CH1 está codificado en el segmento génico correspondiente a la región constante de HcAbs, una mutación puntual lleva a su exclusión mediante splicing durante el proceso de maduración del ARNm[39].

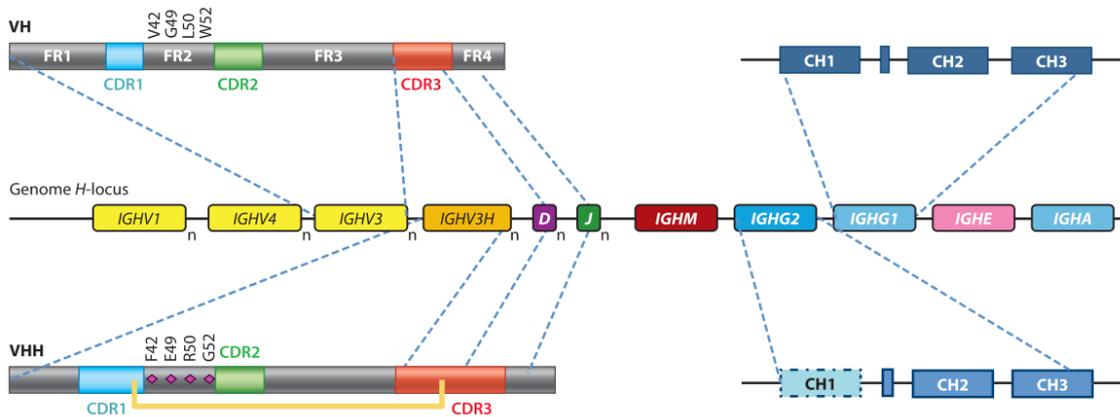


Figura 2 | Esquema simplificado del locus IGH de camélidos. Los segmentos génicos V que dan lugar a dominios VH pertenecen a los grupos IGHV1, IGHV4 e IGHV3, mientras que aquellos que dan lugar a dominios VHH pertenecen al grupo IGHV3H. Mediante recombinación somática estos segmentos se unen a segmentos D y J, que se agrupan en un cluster “compartido” por ambos tipos de segmentos V. Corriente abajo se observan los segmentos codificantes para las regiones constantes de las diferentes clases de anticuerpos (se omiten algunas por simplicidad). El dominio CH1 codificado por el segmento IGHG2 (que da lugar a la región constante de IgG2, un HcAb) es eliminado durante el proceso de splicing (representado por una línea punteada). En la parte superior e inferior izquierda de la figura se esquematizan los dominios VH y VHH, destacando las sustituciones aminoacídicas más relevantes presentes en la región FR2, así como un enlace disulfuro que en algunos casos conecta las regiones CDR1 y CDR3. Imagen modificada de Muyldermans, S.; 2013[35].

El dominio VHH es similar al dominio variable de los anticuerpos convencionales (VH) en su estructura general: está compuesto por cuatro regiones framework (FR) y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Sin embargo, presenta ciertas diferencias destacables, como la sustitución de ciertos residuos conservados en FR2 (que en dominios VH participan en la interacción con la cadena liviana) por residuos más hidrofílicos: Val42, Gly49, Leu50 y Trp52 son sustituidos por Phe/Tyr42, Glu49, Arg/Cys50 y Gly52[40-42]. Estas sustituciones no inducen cambios importantes en la estructura terciaria del dominio[43, 44], pero son suficientes para suprimir la interacción establecida típicamente entre VH y VL, mediada por residuos hidrofóbicos[45]. Además, contribuyen a la solubilidad del dominio VHH. En algunos casos, estos dominios pueden presentar residuos de cisteína no canónicos en regiones CDR y FR, así como una región CDR3 más larga que el promedio[41]. Este CDR3 extendido suele presentar un enlace disulfuro adicional, generalmente con una cisteína en CDR1 o FR2[42], que contribuye a la estabilización del dominio y podría servir para ampliar el espectro de conformaciones que puede adoptar este loop[46].

La presencia del CDR3 extendido, así como la forma convexa de su parátipe, son características que permiten la unión del VHH a epítopes que generalmente no son accesibles a los anticuerpos convencionales, como sitios activos de enzimas y epítopes crípticos virales[47, 48]. Se cree que este fue uno de los principales factores que impulsó la evolución de los HcAbs, ya que adicionados a los anticuerpos convencionales permiten ampliar el espectro de reconocimiento inmune[49].

Dentro del grupo de HcAbs, alrededor del 10% de los anticuerpos no presenta el dominio característico VHH, sino que presenta un dominio muy similar al VH de anticuerpos convencionales. El mismo ha sido denominado VH soluble o *non-classical* VHH, dado que no presenta las sustituciones características de los VHH en FR2. En su lugar, suelen presentar un CDR3 largo capaz de compensar interacciones perdidas por la ausencia de la cadena liviana, y presentan además la sustitución Trp118Arg, eliminando un residuo esencial para la interacción con la cadena liviana en anticuerpos convencionales[50, 51].

Los HcAbs homodiméricos se han observado también en algunas especies de peces cartilaginosos, como el tiburón nodriza (*Ginglymostoma cirratum*). Este tipo de anticuerpo fue denominado IgNAR (por *new antigen receptor*) y su dominio variable V-NAR[52]. Los mismos están presentes en todos los elasmobranchios, un grupo que incluye los tiburones modernos y las rayas, lo cual sitúa su origen evolutivo al menos hace 220 millones de años[49]. Los HcAbs de camélidos presentan un origen claramente independiente, y se estima que surgieron hace 25 millones de años, evolucionando a partir de los anticuerpos convencionales en un ancestro común a las especies de camélidos actuales[49].

Sin embargo, al comparar ambos tipos de HcAbs se evidencia evolución convergente. Las características compartidas incluyen la ausencia de un dominio CH1 convencional y sustituciones en lo que sería la interfase VH-VL, favoreciendo residuos más hidrofílicos. Además, en ambos casos se observan parátipes de superficie convexa y, en algunos casos, enlaces disulfuro adicionales que estabilizan un CDR3 extendido[49, 53]. La comparación resulta interesante, ya que indicaría que estas características son adaptaciones necesarias a las restricciones impuestas por la ausencia de cadenas livianas.

Los camélidos son capaces de producir HcAbs de alta afinidad contra antígenos diversos. Este hecho inicialmente resultó llamativo, ya que estos anticuerpos carecen de la diversidad combinatoria que en anticuerpos convencionales está dada por el apareamiento aleatorio de cadenas pesadas y livianas. Una hipótesis temprana fue que esto podría compensarse mediante una mayor variabilidad en las regiones FR, pero se verificó posteriormente que las regiones FR de dominios VHH son aún más conservadas que en dominios VH[54]. Diversas características en la estructura del dominio VHH han sido señaladas como posibles mecanismos compensatorios para esta pérdida de diversidad. Una de ellas, como se mencionó anteriormente, es la presencia de regiones hipervariables de mayor longitud, particularmente CDR3, aunque esto no se observa en todos los casos, y en particular en llamas esta característica es menos pronunciada[40]. Por otra parte, se ha observado que los dominios VHH presentan mayor variabilidad conformacional en sus regiones CDR en comparación con los dominios VH. Mientras que en humanos y ratones las regiones CDR1 y CDR2 suelen adoptar ciertas conformaciones canónicas definidas, las regiones correspondientes en VHH no suelen presentar los residuos clave que soportan estas estructuras. Este repertorio ampliado de posibles conformaciones para estos loops podría constituir otro mecanismo compensatorio[42].

Otro aspecto llamativo es que los anticuerpos convencionales establecen con su antígeno, en promedio, 67 interacciones, mientras que para HcAbs el promedio es de 28 interacciones. Por este motivo, las interacciones establecidas por HcAbs deben ser, en promedio, más favorables, dado que las afinidades alcanzadas por ambos tipos de anticuerpos son similares. En un estudio realizado por Zavrtanik *et al*, se identifican varios aspectos estructurales de la interacción antígeno-anticuerpo en HcAbs que confirman esta observación[55]. A diferencia de los anticuerpos convencionales, los epítopes de HcAbs suelen ser más rígidos y estructurados, por lo cual la unión a ellos estaría acompañada de un menor costo entrópico. Por otra parte, se ha observado que por lo general la superficie de los parátopes de anticuerpos convencionales, en contraste con HcAbs, presenta una menor complementariedad con la superficie de sus epítopes, atrapando moléculas de solvente en la interfase, lo cual tampoco es favorable desde el punto de vista entrópico. Finalmente, se observó que los parátopes de HcAbs se encuentran más enriquecidos en residuos hidrofóbicos, por lo cual la unión al antígeno resultaría más favorable dado el efecto hidrofóbico, debido a que la unión al antígeno evita la exposición de estos residuos al solvente. Este conjunto de factores podría contribuir a explicar las altas afinidades alcanzadas por HcAbs a pesar del menor número de interacciones establecidas.

Los epítopes rígidos y estructurados reconocidos por HcAbs suelen además ser más conservados. Dado que patógenos microbianos y virales suelen adaptarse rápidamente para la evasión de la respuesta inmune, la posibilidad de reconocer epítopes más conservados podría ser otra de las ventajas que impulsó la evolución de este tipo de anticuerpos.

3.2 Nanobodies

Dado que en los HcAbs la unión al antígeno se da a través de un único dominio, ya sea VHH o VH soluble, es posible generar a partir de ellos fragmentos monodominio de unión a antígeno. Estos dominios aislados, denominados nanobodies (Nbs), constituyen una herramienta

biotecnológica con un amplio rango de aplicaciones, y presentan diversas ventajas respecto a los anticuerpos convencionales y sus fragmentos derivados, como los fragmentos variables de cadena única (scFv). Los scFv son la mínima unidad funcional de unión a antígeno que puede obtenerse a partir de un anticuerpo heterotetramérico, y están formados por la fusión de los dominios variables de la cadena pesada y liviana a través de un péptido linker (**figura 3**).

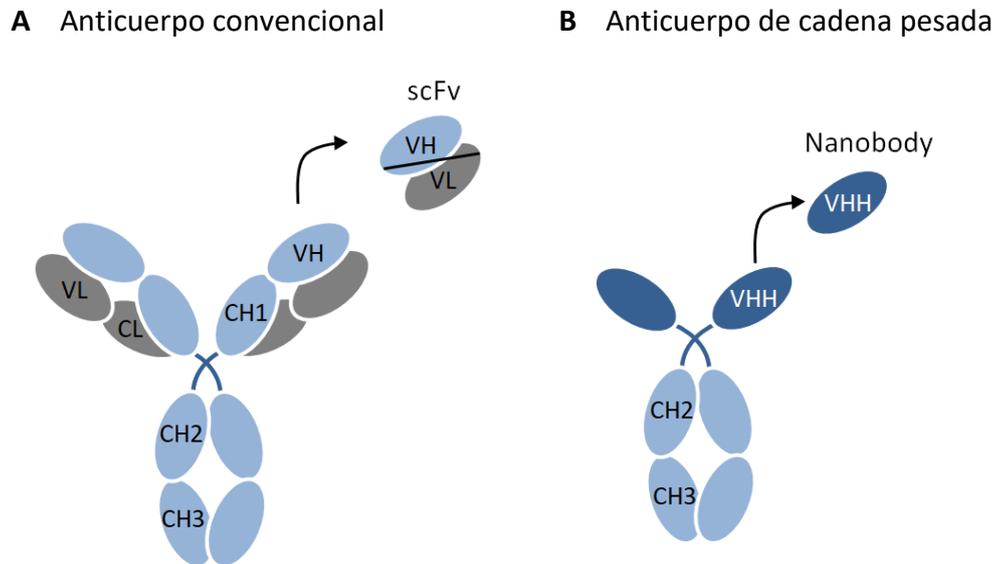


Figura 3 | Representación esquemática de un anticuerpo IgG convencional (A) y un anticuerpo de cadena pesada (HcAb) (B). Se representan además los mínimos fragmentos funcionales que pueden obtenerse a partir de cada tipo de anticuerpo. Los scFv, derivados de anticuerpos convencionales, consisten de los dominios VH y VL unidos mediante un péptido linker. El dominio VHH, derivado de HcAbs, se denomina nanobody (Nb) cuando es expresado en forma aislada.

Los nanobodies son proteínas de pequeño tamaño, con un peso molecular que ronda los 15 kDa. Se ha logrado generar nanobodies contra una gran diversidad de antígenos, cuyas afinidades pueden ser tan altas como las de anticuerpos convencionales[56]. Sus constantes de disociación usualmente se encuentran en el extremo bajo del rango nanomolar, y ocasionalmente en el orden picomolar[57, 58]. Además, presentan la gran ventaja de poder ser expresados fácilmente y con buenos rendimientos en sistemas bacterianos[59].

El uso de nanobodies en diversas áreas ha sido explorado ampliamente. Por ejemplo, su uso como herramientas de investigación a menudo posee ventajas frente a anticuerpos convencionales. Su expresión intracelular en tándem a proteínas fluorescentes como GFP permite el seguimiento de antígenos en distintos compartimentos celulares[60]. Por otra parte, los nanobodies han sido utilizados para favorecer la cristalización de proteínas altamente flexibles, ya que son capaces de estabilizarlas en una conformación particular[61]. Asimismo, los nanobodies presentan importantes ventajas como herramientas de imagenología *in vivo*, ya que debido a su pequeño tamaño poseen mayor capacidad de

penetración en tejidos y los nanobodies que no reaccionaron son rápidamente eliminados por filtración renal[62].

Por otra parte, los nanobodies son herramientas idóneas para su aplicación en el desarrollo de inmunoensayos. Son altamente estables ante condiciones como alta temperatura, en algunos casos manteniendo su unión al antígeno a 70 °C o más sin afectarse su capacidad de unión al antígeno[56, 63, 64]. Además, los nanobodies suelen ser estables ante la presencia de agentes desnaturizantes y de solventes en altas concentraciones[56, 65, 66], por lo que son adecuados para utilizar en ensayos que requieren la incubación de muestras en estas condiciones. Los nanobodies han sido implementados en una variedad de inmunoensayos, incluyendo ensayos diagnósticos para la detección de biomarcadores o antígenos de patógenos, y ensayos para la detección de pequeñas moléculas de interés ambiental, entre otros[67].

Una ventaja esencial de la aplicación de nanobodies en inmunoensayos es la posibilidad de generar reactivos altamente estandarizados. A partir de su secuencia codificante, de aproximadamente 400 pb, los nanobodies pueden ser producidos en forma recombinante en sistemas procariotas mediante procedimientos sencillos. De esta forma, pueden ser reproducidos fácilmente por diferentes laboratorios, asegurando una fuente renovable y fiable de reactivos estandarizados.

El pequeño tamaño de los nanobodies facilita su subclonado en diversos vectores, permitiendo la generación de construcciones modulares para su expresión en tándem con otros nanobodies, otras proteínas o pequeños péptidos de interés[68]. Esta característica los convierte en una potente herramienta para, entre otras aplicaciones, la generación de quimeras con proteínas reporteras para su aplicación en inmunoensayos.

3.3 Selección de nanobodies

Para la obtención de nanobodies contra un determinado antígeno, es necesario generar algún tipo de biblioteca a partir de la cual pueda realizarse la selección de aquellos clones con la especificidad deseada. Existen diversas estrategias para la generación de bibliotecas, y una de las formas de clasificarlas es según el origen del repertorio de genes utilizados. La estrategia clásica es la generación de bibliotecas inmunes, donde los genes son obtenidos de un animal inmunizado. Las mismas presentan la ventaja de que los anticuerpos fueron sometidos a un proceso de maduración de la afinidad *in vivo*, y se puede esperar que posean una amplia representación de clones contra el antígeno de interés. Por otra parte, las bibliotecas naïve son construidas a partir de genes de animales no inmunizados, y son muy útiles cuando los antígenos son tóxicos o poco inmunogénicos, aunque presentan la desventaja de requerir un tamaño de biblioteca varios órdenes de magnitud superior para lograr obtener clones con la especificidad deseada[69]. Además, a menudo es necesario aplicar métodos de maduración de la afinidad *in vitro* para lograr obtener clones de alta afinidad. Finalmente, las bibliotecas sintéticas presentan características similares a las bibliotecas naïve, con la gran ventaja de evitar el uso de animales, aunque, a diferencia de las naïve, los nanobodies no han sido

seleccionados *in vivo* para presentar un plegamiento correcto, por lo que el plegamiento de los clones obtenidos puede ser una limitante[70].

Una vez que se obtiene un pool de genes de anticuerpos, se utiliza para la selección la tecnología de presentación (*Display*) de anticuerpos. Los sistemas de *Display* se caracterizan por establecer un vínculo entre cada uno de los anticuerpos de la biblioteca y la secuencia génica que lo codifica, denominado acoplamiento fenotipo-genotipo, permitiendo la identificación de clones de interés de manera high-throughput.

Phage *Display* fue la primera tecnología de presentación de anticuerpos disponible, desarrollada en 1985 y adaptada para la selección de fragmentos de anticuerpos en 1990[71, 72]. La misma se basa en la presentación de los anticuerpos en la superficie de virus bacteriófagos (fagos), mediante la fusión de los mismos a una proteína normalmente expresada en la superficie de la partícula. Luego de un proceso denominado panning, que permite el enriquecimiento de la biblioteca en clones específicos, los clones individuales suelen ser analizados mediante ELISA para la selección de aquellos con las propiedades deseadas.

Desde entonces han surgido otras tecnologías de *Display*, como aquellas basadas en la presentación de anticuerpos sobre la superficie de células. En este caso, los anticuerpos son expresados fusionados a una proteína que permite su anclaje en la membrana o pared celular, para lo cual pueden utilizarse levaduras (*Yeast Display*)[73], bacterias (*Bacterial Display*)[74] o células de mamífero (*Mammalian Cell Display*)[75]. En estos casos, el proceso de selección y caracterización de los clones se realiza mediante citometría de flujo y cell-sorting utilizando antígeno marcado[70]. Una de las ventajas de estos métodos es que permiten la normalización de la señal generada por la unión a antígeno en función del nivel de anticuerpo presentado en la superficie, otorgando la posibilidad de seleccionar clones en función exclusivamente de su afinidad. Por otra parte, presentan la desventaja de que la diversidad de las bibliotecas que puede alcanzarse utilizando tecnologías basadas en células es menor que para *Phage Display*[76].

También se han generado tecnologías de *Display* libres de células, basadas en una asociación directa entre el anticuerpo y la secuencia nucleotídica que lo codifica. Un aspecto destacado de estos sistemas es que no requieren una etapa de transformación, donde la eficiencia puede resultar limitante para la construcción de otros tipos de bibliotecas[70]. Dentro de esta categoría se destaca *Ribosome Display*, basado en la formación de un complejo ternario ARNm-ribosoma-proteína[77], y las tecnologías de mRNA y cDNA *Display*, donde se establece un enlace covalente directamente entre la proteína de interés y el ácido nucleico que la codifica[78, 79].

Para la generación de bibliotecas inmunes, independientemente del sistema de *Display* empleado, el uso de nanobodies presenta la enorme ventaja de constituir una representación más fiel del repertorio inmune. Esto se debe a que para la generación de bibliotecas de anticuerpos convencionales, o fragmentos como Fab y scFv, se requiere la amplificación mediante PCR de fragmentos de las cadenas pesada y liviana por separado. Durante la construcción de la biblioteca, los mismos son necesariamente “barajados”, de forma que los apareamientos originales sólo se recuperan con baja frecuencia. Este problema es evitado al

construir bibliotecas de nanobodies, por lo cual una biblioteca de mucho menor tamaño puede proveer una representación completa del repertorio inmune[80].

3.4 Phage Display

A pesar de la abundancia de métodos disponibles en la actualidad, Phage Display continúa siendo la tecnología de presentación de anticuerpos más utilizada. Existen diferentes versiones de esta técnica basadas en distintas especies de fagos, siendo el sistema más ampliamente aplicado el basado en el fago filamentoso M13[81], que infecta bacterias *E. coli* que presentan pili F[82], el cual funciona como receptor para este virus. El fago no impide el crecimiento y división de las células, aunque sí afecta la velocidad de estos procesos[83]. M13 presenta un genoma de ADN simple cadena circular que codifica 11 proteínas, incluyendo 5 proteínas de cápside (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX) y 6 proteínas relacionadas con la replicación del genoma y el ensamblaje del virión (pI, pII, pIV, pV, pX y pXI)[81].

Para la selección de nanobodies a partir de una biblioteca inmune mediante Phage Display, la construcción de la biblioteca implica la purificación de células mononucleares de sangre periférica del animal inmunizado, extracción de su ARN y amplificación de los dominios variables de HcAbs mediante retro-transcripción seguida de PCR. Posteriormente, las secuencias amplificadas son clonadas en un vector fagémido, el cual contiene un origen de replicación del fago M13, una señal de encapsidación y el gen que codifica el fragmento a expresar fusionado al gen de la proteína de superficie pIII, de la cual cada partícula viral presenta aproximadamente 5 copias[81]. Finalmente, este vector es transformado en bacterias *E. coli* para la generación de la biblioteca (**figura 4**). Dado que el vector fagémido no codifica todas las proteínas necesarias para la formación de la partícula viral, es necesario realizar una infección con un fago auxiliar (fago *helper*) cuyo genoma codifica estas proteínas. Los vectores fagémidos se utilizan como alternativa al clonado de los fragmentos directamente en el genoma del fago, ya que presentan mayor eficiencia de transformación en bacterias, permitiendo la construcción bibliotecas de mayor tamaño[81].

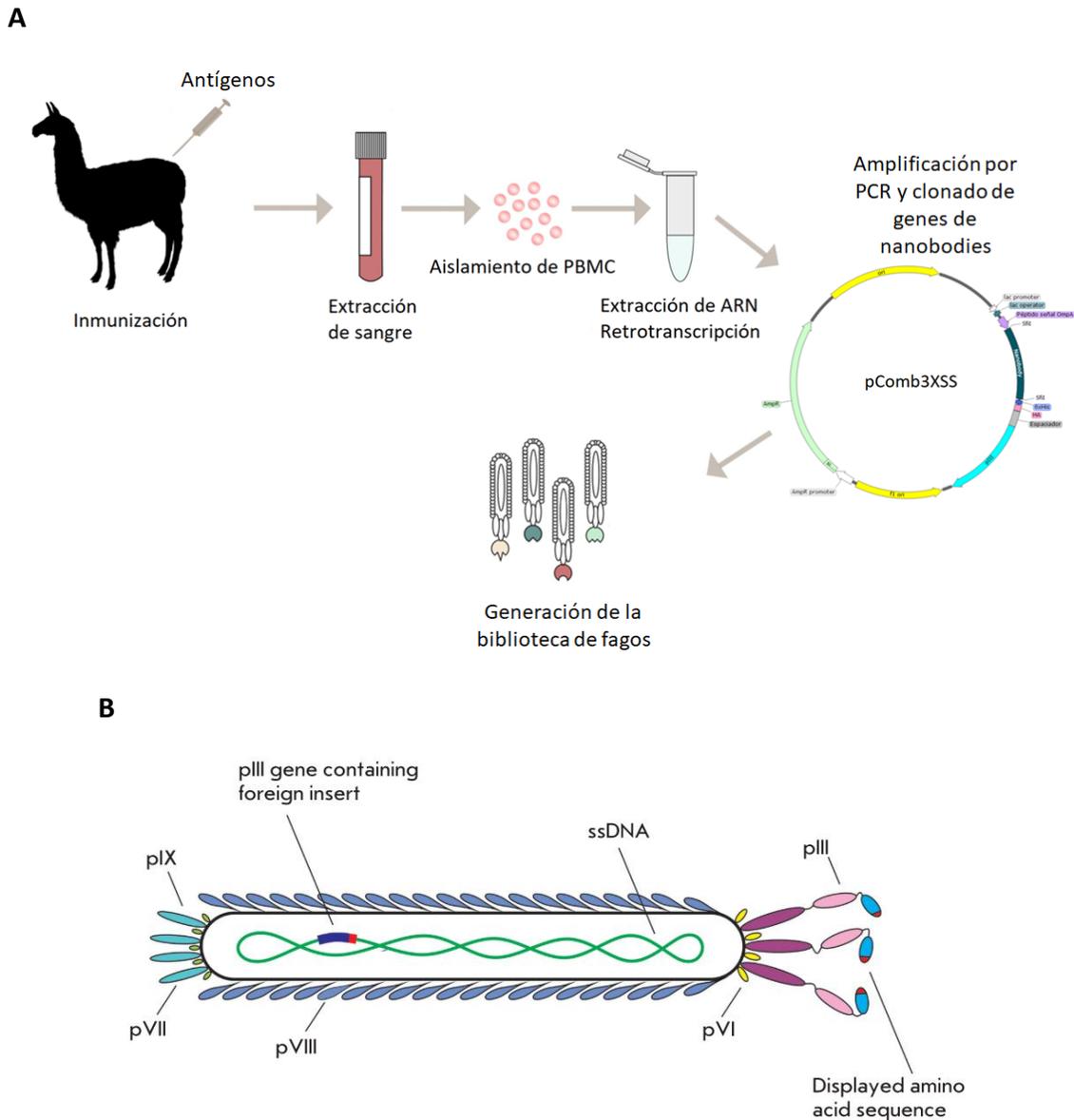


Figura 4 | Construcción de una biblioteca de fagos filamentosos. (A) Etapas involucradas en la generación de una biblioteca inmune, desde la inmunización de un camélido (en este caso una llama) hasta la obtención de la biblioteca de fagos. **(B)** Estructura de un fago filamentosos que presenta una proteína foránea fusionada a su proteína de cápside pIII. Imagen (B) modificada de Nemudraya, A.A. *et al*; 2016[82].

Una vez construida la biblioteca, se realiza un proceso de panning para la selección de clones con capacidad de unión al antígeno de interés (**figura 5**). El antígeno debe ser inmovilizado sobre una superficie sólida (típicamente pocillos de ELISA, aunque también puede realizarse panning sobre otros soportes, como perlas magnéticas o células que expresen el antígeno en su superficie)[76] sobre la cual se incubaba la biblioteca de fagos, y luego de realizar lavados rigurosos los fagos unidos en forma específica pueden ser eluidos mediante diferentes métodos, como el agregado de medios ácidos, moléculas competidoras o enzimas proteolíticas. Los fagos eluidos pueden ser amplificados mediante una co-infección con fago

helper de bacterias *E. coli* en crecimiento, y someterse a nuevas rondas de panning para promover el enriquecimiento en clones específicos[84]. Finalmente, a partir del conjunto de fagos enriquecido en clones específicos contra el antígeno de interés, debe realizarse un proceso de screening para seleccionar los clones de mayor interés. Este screening generalmente es realizado mediante ELISA, aunque también se utilizan otras técnicas como inmunoblot y citometría de flujo[76].

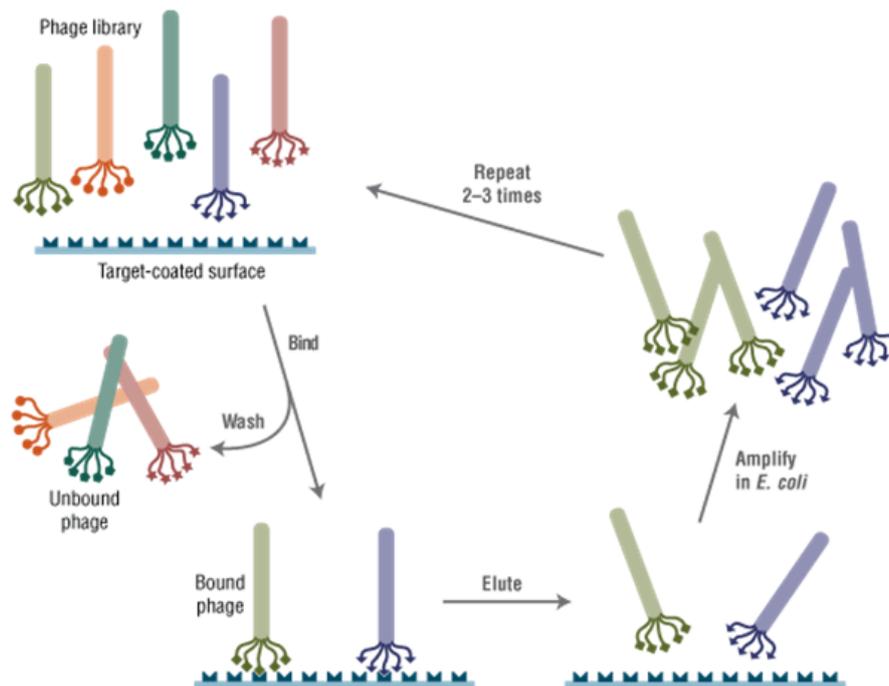


Figura 5 | Etapas del proceso de panning para la selección de anticuerpos a partir de una biblioteca de fagos filamentosos. En una primera etapa (esquina superior izquierda) se adiciona la biblioteca a pocillos de ELISA sobre los cuales se ha inmovilizado el antígeno. Luego de una incubación que permite la unión de los fagos que presentan un anticuerpo con especificidad contra el antígeno, los fagos no unidos son eliminados mediante lavados exhaustivos. Finalmente, los fagos son eluidos y pueden ser amplificados mediante una co-infección de un cultivo de *E. coli* con fago helper. El amplificado resultante puede utilizarse posteriormente para realizar una nueva ronda de panning (típicamente se realizan 2 o 3 rondas).

4. La infección por el virus SARS-CoV-2 y su diagnóstico mediante tests de antígeno

Esta tesis se llevó adelante en el período en que surgió y se instaló la pandemia de COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2. En ese contexto, gran parte de los esfuerzos de investigación se volcaron a desarrollar un test de detección de antígeno que pudiera ser utilizado en el diagnóstico de la infección de este virus y, como parte de esto, se decidió colocar parte del foco de esta tesis en este modelo.

Los coronavirus (virus de la familia *Coronaviridae*) son virus patógenos de humanos y otros animales. Cuatro especies de esta familia son endémicas en humanos (HCoV-HKU1, HCoV-229E, HCoVNL63 y HCoV-OC43) y circulan a nivel mundial, mayormente infectando las vías respiratorias superiores e inferiores y causando enfermedad leve[85]. En 2002 surgió un nuevo coronavirus, actualmente conocido como SARS-CoV-1, que se propagó por varias regiones del mundo afectando a aproximadamente 8000 personas, con una tasa de letalidad de alrededor del 10%[86, 87]. Este virus, de origen zoonótico, actualmente no circula en la población, habiéndose registrado los últimos casos en 2004[85]. Por otro lado, otro coronavirus de origen zoonótico, MERS-CoV, fue identificado por primera vez en 2012. Desde entonces este virus ha causado brotes esporádicos, y hasta el momento se han reportado aproximadamente 2600 casos, con una tasa de letalidad de alrededor del 35%[88, 89]. La transmisión entre humanos es limitada, y muchas de las infecciones se originan del contacto con dromedarios, que actúan como reservorios de este patógeno[90].

A fines de 2019 se reportaron los primeros casos de un nuevo coronavirus de origen zoonótico, denominado SARS-CoV-2, causante de la enfermedad conocida como COVID-19, que en poco tiempo dio lugar a una pandemia. Aunque este virus presenta un 79% de identidad de secuencia con el virus SARS-CoV-1[91], su tasa de letalidad es notoriamente menor, de alrededor del 1%. Entre el surgimiento del virus y fines de 2023, se registraron más de 772 millones de casos confirmados[92].

SARS-CoV-2 es un virus envuelto, con un genoma ARN simple cadena de polaridad positiva. Codifica cuatro proteínas estructurales: proteína de membrana (M), proteína de nucleocápside (N), proteína de envoltura (E) y proteína Spike (S) (**figura 6**). Además, codifica un conjunto de proteínas no estructurales que componen la maquinaria de replicación y transcripción del virus, así como proteínas accesorias con funciones que no son esenciales para la replicación viral pero se relacionan a la patogénesis[93].

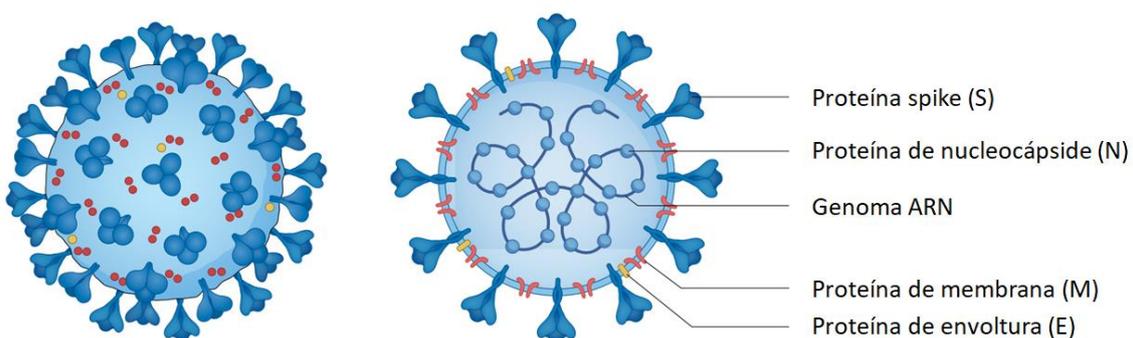


Figura 6 | Estructura del virión de SARS-CoV-2. Se destacan las cuatro proteínas estructurales: proteína de membrana (M), proteína de nucleocápside (N), proteína de envoltura (E) y proteína Spike (S). Imagen modificada de Lamers, M. M. *et al*; 2022[94].

Las proteínas N y S son dos de las más estudiadas en este virus, por su gran relevancia para la terapia y diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2. La proteína S es determinante del

tropismo, uniéndose al receptor del hospedero ACE-2 (enzima convertidora de angiotensina 2), expresado principalmente por células del tracto respiratorio inferior. Se trata de una proteína de membrana glicosilada con una masa molecular aproximada de 180-200 kDa, que se encuentra en la superficie del virus en forma de trímeros[95]. Dada su función central en el ingreso del virus a las células, la proteína S es el blanco de terapias que emplean anticuerpos monoclonales neutralizantes y es el principal antígeno vacunal. Sin embargo, es la proteína del virus que presenta la mayor tasa de mutación, lo cual representa un desafío importante para estas terapias[96].

La proteína N es una proteína de 46 kDa cuya función primaria es el empaquetamiento del genoma viral para formar la nucleocápside. Además, se ha observado que en distintos coronavirus esta proteína contribuye a la regulación del ciclo viral, participando de la replicación del genoma viral[97, 98] y alterando procesos celulares del hospedero[99]. La proteína N está constituida por un dominio amino-terminal, un dominio carboxilo-terminal y tres regiones intrínsecamente desordenadas, en los extremos amino- y carboxilo-terminales de la proteína y conectando ambos dominios[100].

A diferencia de la proteína S, la proteína N se encuentra en el interior de la partícula viral y no cumple un rol en el ingreso del virus a la célula, por lo cual, en comparación con la proteína S, se encuentra sometida a una menor presión selectiva por parte del sistema inmune[101, 102]. Por este motivo, la proteína N presenta una menor tasa de mutación, y las mutaciones que presenta suelen acumularse en las regiones intrínsecamente desordenadas[103].

Al compararla con la proteína N de los demás coronavirus humanos que continúan en circulación, la proteína N ha divergido significativamente, presentando un 48,5% de identidad con MERS-CoV, 36,7% con HCoV-HKU1, 28,8% con HCoV-229E, 48,3% con HCoVNL63 y 38,4% con HCoV-OC43. Sin embargo, presenta un motivo altamente conservado en el dominio amino-terminal (FYVLGTGP)[104]. Durante el brote de SARS-CoV-1, se observó que al desarrollar ensayos serológicos para evaluar la respuesta de anticuerpos generada contra este virus esta región comprometía la especificidad de los ensayos, dado que la presencia de anticuerpos contra otros coronavirus generaba falsos positivos. Por este motivo, se propuso el uso de una versión truncada de la proteína N carente de los primeros 121 residuos (N Δ 121), que permitía el desarrollo de ensayos serológicos de alta especificidad[105]. Desde entonces, la proteína N Δ 121 ha sido utilizada para otras aplicaciones, como por ejemplo en la inmunización de animales con el objetivo de generar anticuerpos de mayor especificidad para una especie de coronavirus[106].

Durante la pandemia causada por SARS-CoV-2, el gran número de personas infectadas y la alta carga viral generada por la infección proporcionaron condiciones propicias para el surgimiento y selección de mutaciones. La acumulación de mutaciones dio lugar a variantes distintivas del virus, algunas de las cuales, en función de su mayor transmisibilidad, fueron clasificadas como “variantes de preocupación”. Variantes como Alfa, Beta, Gamma, Delta y Omicron evolucionaron en forma independiente, y cada una de ellas llegó a desplazar, a nivel regional o global, variantes previamente circulantes[107]. La variante Omicron y sus subvariantes derivadas han causado olas sucesivas de infección desde su identificación por primera vez a

finis de 2021. Actualmente, diferentes subvariantes de Omicron circulan simultáneamente y han desplazado casi completamente a las variantes que circulaban previamente[108].

La generación de inmunidad en la población, tanto a través de la infección natural como de la vacunación, ha contribuido significativamente a la disminución de casos de enfermedad grave y mortalidad a causa de la infección. Sin embargo, debido al surgimiento de nuevas variantes, el efecto de esta inmunidad en la prevención de la transmisión ha sido limitado[109, 110]. Por este motivo, el diagnóstico oportuno de la infección fue un pilar fundamental para el control de los contagios durante toda la duración de la pandemia.

4.1 Diagnóstico de infección por SARS-CoV-2

La identificación y el aislamiento de individuos infectados por SARS-CoV-2 fueron esenciales para limitar la transmisión durante la pandemia de COVID-19. Para el diagnóstico de la infección, el análisis por retro-transcripción y PCR cuantitativa (RT-qPCR) de muestras de hisopado nasofaríngeo es el método de referencia[111]. Se trata de un método específico y altamente sensible, y al inicio de la pandemia su uso se extendió ampliamente convirtiéndolo en el principal método diagnóstico para la infección por SARS-CoV-2. Sin embargo, este método requiere de instrumentos y reactivos costosos para llevarse a cabo, así como personal especializado, por lo cual durante brotes de infección el uso exclusivo de esta técnica puede resultar limitante, dificultando lograr una interrupción efectiva de la transmisión[112]. En este contexto se evidenció la necesidad de contar con métodos diagnósticos alternativos que fueran más rápidos y de bajo costo. Como resultado, se desarrollaron distintos ensayos para la detección de antígeno.

Los “tests de antígeno”, además de su rapidez y bajo costo, no requieren instrumentos y personal tan especializado como el análisis por RT-qPCR. Si bien presentan una menor sensibilidad, la detección de antígeno tiene una mejor correlación que la RT-qPCR con la presencia de virus viable, determinada mediante métodos de cultivo viral[113, 114], y por lo tanto resultan más adecuados para la identificación de aquellos individuos con mayor capacidad de contagio (**figura 7**). Por estos motivos, los ensayos de detección de antígeno se volvieron inicialmente un complemento esencial a los métodos moleculares y eventualmente pasaron a ser el principal método utilizado para el diagnóstico.

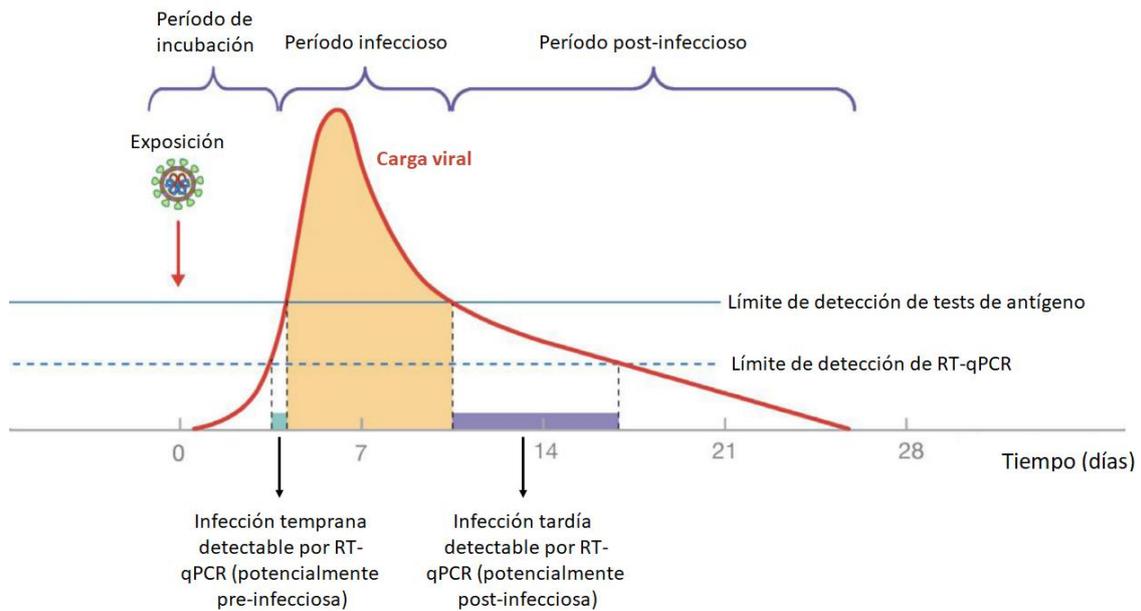


Figura 7 | Representación esquemática de la evolución de la carga viral a lo largo de una infección por SARS-CoV-2. La RT-qPCR presenta un límite de detección inferior a los tests de antígeno, por lo cual da un resultado positivo durante un período más amplio de la infección. Sin embargo, la ventana de positividad de los tests de antígeno coincide en gran medida con el período infeccioso, por lo que resultan más adecuados para la identificación de aquellos individuos con mayor capacidad de contagio. Imagen modificada de Polechová, J. *et al*; 2022[115].

La gran mayoría de los ensayos de detección de antígeno se basan en el uso de anticuerpos convencionales monoclonales, y tienen como antígeno blanco a la proteína N. Se trata del antígeno de mayor expresión en las etapas iniciales de la infección[116, 117], y por lo tanto permite el desarrollo de ensayos más sensibles que aquellos que detectan otras proteínas virales, como la proteína S[118]. Además, dado que presenta una menor tasa de mutación que la proteína S, los anticuerpos utilizados para su detección tienen una mayor probabilidad de ser reactivos contra variantes emergentes[119, 120], lo cual es otra característica que lo convierte en el antígeno idóneo para el desarrollo de estos ensayos.

5. Detección de IgE humana

Otro biomarcador con el que se trabajó en esta tesis fue la IgE humana, que se utilizó como modelo en la exploración de un método de alta capacidad de procesamiento orientado a la selección de pares de nanobodies óptimos para la detección de este antígeno.

La detección de IgE humana en suero es de gran relevancia a nivel clínico, siendo la cuantificación de IgE total sérica (tIgE) uno de los parámetros tomados en cuenta en el diagnóstico de enfermedades alérgicas mediadas por IgE, así como otros trastornos de base inmunológica. A modo de ejemplo, es uno de los parámetros utilizados en el diagnóstico de enfermedades como rinitis alérgica[121] y dermatitis atópica[122], y en este último caso los niveles de IgE total sérica están asociados además con la severidad de la enfermedad[122].

Otra aplicación destacable de la determinación de tIgE es la predicción de la respuesta al tratamiento con omalizumab. El omalizumab es un anticuerpo terapéutico utilizado en el tratamiento de alergias, que se une a la IgE humana bloqueando su interacción con su receptor de alta afinidad FcεRI en basófilos y mastocitos[123]. Por ejemplo, se ha demostrado que la respuesta al tratamiento con omalizumab en pacientes con urticaria espontánea crónica puede predecirse determinando sus niveles de tIgE y el cambio en estos niveles al comenzar el tratamiento[124].

Actualmente, algunos de los métodos más utilizados para la determinación de tIgE son ImmunoCAP® (PHADIA, Thermo) e Immulite (Siemens). Estos sistemas presentan la desventaja de que el equipamiento y reactivos requeridos son sumamente costosos[125].

Un desafío asociado al desarrollo de herramientas para la inmunodetección de IgE es el aseguramiento de que las mismas no presenten reactividad cruzada con ninguna otra inmunoglobulina humana. La ausencia de reactividad cruzada es un aspecto importante dado que los niveles promedio de IgE sérica son 6 órdenes de magnitud menores que los de otras inmunoglobulinas (en adultos, el nivel promedio de IgE sérica es 50 ng/mL, mientras que el de IgG es 13,5 mg/mL)[126], por lo cual incluso niveles bajos de reactividad cruzada pueden interferir en la cuantificación.

Las herramientas de inmunodetección de IgE, además de ser utilizadas para la cuantificación de este antígeno en circulación (tIgE), pueden aplicarse a la detección de IgE alérgeno-específica (sIgE). Este parámetro también cumple un rol importante en el diagnóstico de alergia, contribuyendo a identificar el agente desencadenante de los síntomas[127]. Tradicionalmente este diagnóstico se realiza mediante pruebas de exposición en la piel, utilizando generalmente extractos de los alérgenos[128]. Este método es invasivo y puede desencadenar reacciones alérgicas importantes, particularmente en el diagnóstico de alergias en niños. Además, se trata de una metodología difícil de estandarizar. Por esta razón, ha cobrado gran importancia el diagnóstico *in vitro*, donde la IgE alérgeno-específica es detectada en suero. Inicialmente el mismo se basó también en el uso de extractos de alérgenos, pero actualmente se favorece cada vez más el llamado diagnóstico molecular, o diagnóstico por componentes. En esta estrategia, los antígenos individuales desencadenantes de los síntomas son purificados de fuentes naturales u obtenidos mediante expresión recombinante[129]. A diferencia del diagnóstico basado en extractos, los cuales pueden contener componentes contra los que haya reactividad cruzada, el diagnóstico molecular permite mayor precisión a la hora de identificar el agente desencadenante. Asimismo, permite evaluar el riesgo de reacciones severas y facilitar la selección de pacientes para inmunoterapia específica[130].

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtención y selección de nanobodies para su aplicación en inmunoensayos diagnósticos, mediante su fusión con la luciferasa NanoLuc.

Objetivos específicos

1. Exploración del uso de NanoLuc como enzima reportera utilizando como modelo su fusión con un nanobody anti-microcistina.
2. Obtención y selección de nanobodies contra la proteína de nucleocápside de SARS-CoV-2.
3. Desarrollo de un inmunoensayo que permita la detección de dicho antígeno en muestras de hisopado nasofaríngeo.
4. Desarrollo de un método de screening masivo de nanobodies utilizando bibliotecas de quimeras Nanobody-NanoLuc.
5. Aplicación del método anterior para la selección de pares de nanobodies que permitan detectar IgE humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Protocolos generales

1.1 Cultivo de *Escherichia coli*

Los cultivos bacterianos de *E. coli* fueron incubados, excepto si se indica lo contrario, a 37 °C bajo agitación a 250 rpm. Las concentraciones finales de los diferentes antibióticos utilizados para suplementar los medios de cultivo tanto sólidos como líquidos fueron las siguientes: tetraciclina 10 µg/mL, ampicilina 100 µg/mL, kanamicina 40 µg/mL y cloranfenicol 35 µg/mL.

1.2 Transformación

Las transformaciones se realizaron mediante electroporación en cubetas de 2 mm (Sigma-Aldrich) utilizando el equipo MicroPulser™ (BIO-RAD). Inmediatamente luego de la electroporación las células se incubaron en medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression: triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, MgCl₂ 10 mM, y glucosa 20 mM, pH 7,0) a 37 °C con agitación a 250 rpm durante 1 hora, y fueron plaqueadas en placas de medio LB agar con el antibiótico correspondiente, las cuales fueron incubadas a 37 °C toda la noche (ON, 16-20 horas).

1.3 Extracción de ADN plasmídico, secuenciación y análisis de secuencias

Se realizaron cultivos ON en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado a partir de colonias aisladas, de las cuales el ADN plasmídico se extrajo utilizando el kit comercial Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen #27104). Las secuencias fueron obtenidas a través del servicio de secuenciación de la empresa Macrogen (Korea) y analizadas utilizando el programa MEGA6.

1.4 ELISA

Para los ensayos en formato ELISA se utilizaron placas de alta adherencia de 96 pocillos transparentes (para ensayos colorimétricos) (Greiner Bio-One #655061) o blancas (para ensayos luminiscentes) (Greiner Bio-One #655074), que fueron sensibilizadas agregando 100 µL de una solución de proteína en buffer fosfato salino (PBS) e incubando durante 1 hora a 37 °C o alternativamente ON a 4 °C. El bloqueo se realizó incubando los pocillos con 200 µL de solución bloqueante durante 30 minutos a 37 °C. Todas las subsiguientes incubaciones se realizaron agregando 100 µL por pocillo e incubando 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 450 rpm. Para el revelado de los ensayos colorimétricos se utilizó una proteína conjugada a peroxidasa de rábano, mientras que para los ensayos luminiscentes se utilizó una quimera nanobody-NanoLuc. En el primer caso, se desarrolló la reacción de revelado incubando 100 µL por pocillo de la solución del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (TMB 0,096 mg/mL y H₂O₂ 0,004% en buffer acetato 0,1 M, pH 5,5) durante 5-15 minutos en las mismas condiciones de temperatura y agitación, luego de lo cual la reacción fue detenida

mediante el agregado de 50 μL de H_2SO_4 2 M. En el caso de los ensayos luminiscentes, se agregaron 100 μL de furimazina 10 μM en buffer NanoLuc (PBS suplementado con Tritón X-100 1%, BSA 0,25 mg/mL y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 8,8 mM, pH 8,0) y se agitó la placa durante 30 s antes de la lectura.

En todos los casos, luego de cada incubación se realizaron 6 lavados con PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T). Para las distintas incubaciones posteriores al bloqueo, a no ser que se indique lo contrario, se utilizó como buffer diluyente una dilución 1/10 en PBS de la solución bloqueante. La lectura de las placas de ELISA se realizó en el equipo FLUOstar OPTIMA. Para ensayos colorimétricos, se realizaron medidas a 450 nm, corrigiendo la medida según el valor de absorbancia a 620 nm para eliminar contribuciones de absorbancia inespecífica. Para ensayos luminiscentes las medidas fueron realizadas con un tiempo de integración de 0,5 s por pocillo.

1.5 PCR

Las reacciones de PCR destinadas a la amplificación de secuencias de nanobodies para su clonado se realizaron utilizando buffer Taq 1X (Thermo Fisher Scientific #B38), MgCl_2 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,3 μM de cada uno de los cebadores, 5 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific #EP0401) y entre 20 y 100 ng de ADN plasmídico como molde, en un volumen final de 100 μL . Las reacciones se desarrollaron según el siguiente programa: 1 minuto a 95 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C; y 10 minutos a 72 °C, en un termociclador LifeECO (BIOER).

1.6 Cuantificación de ADN y proteínas

Las medidas de concentración de ácidos nucleicos (ARN y ADN) y proteínas fueron realizadas utilizando el equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), midiendo absorbancia a 260 nm y 280 nm respectivamente. Para determinar la concentración de ADN se utilizó el coeficiente de absorptividad 0,020 $(\text{ng}/\mu\text{L})^{-1}\text{cm}^{-1}$, mientras que para las proteínas se utilizaron los coeficientes de absorptividad molar estimados a partir de las secuencias aminoacídicas.

1.7 Electroforesis SDS-PAGE

Para la visualización de proteínas se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida 12,5% o 15% en presencia del agente desnaturizante dodecilsulfato sódico (SDS) y en condiciones reductoras, con posterior tinción con solución colorante de azul de Coomassie. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras fueron incorporadas en buffer de carga 6X (Tris-HCl 0,35 M, SDS 10% m/v, glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,175 mM y DTT (ditiotretitol) 0,1 M) y calentadas durante 5 minutos a 100 °C. Se utilizaron los marcadores de peso molecular Pierce Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific #26610), Low Molecular Weight Calibration Kit (Amersham #17-0446-01) y PAGE-MASTER Protein Standard (Genscript #M00516).

1.8 Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar y en algunos casos purificar ADN, se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0), preparado con los

agentes intercalantes de ADN GelRed (Sigma-Aldrich #SCT123) o GoodView (SBS Genetech #HGV-2), que permiten la visualización del ADN bajo luz UV. A las muestras se les agregó la cantidad correspondiente de buffer de carga 6X (Thermo Fisher Scientific #R0611) antes de ser sembradas. Para las purificaciones de ADN a partir de un fragmento de gel de agarosa se utilizó el kit comercial Qiaquick Gel Extraction (Qiagen #28704).

1.9 Análisis de datos y generación de imágenes

Para la generación de gráficos se utilizaron los programas GraphPad Prism 8 y Microsoft Excel. Para la generación de imágenes esquemáticas de secuencias de ADN se utilizó el programa SnapGene Viewer.

2. Vectores utilizados para la expresión de nanobodies

2.1 Vector pComb3X

pComb3X es un vector fagémido desarrollado por Barbas *et al*[131]. Posee un origen de replicación y señal de encapsidación para el fago M13, y como marcador de selección presenta un gen de resistencia a ampicilina. Este plásmido puede incorporarse en partículas virales cuando una célula que lo contiene es infectada con un fago helper que proporcione las restantes proteínas del fago. Codifica la proteína de superficie viral pIII, la cual puede expresarse fusionada a una proteína foránea, en este caso un nanobody, para su presentación en la partícula viral.

El clonado de nanobodies es realizado a través de dos sitios de restricción para la enzima SfiI (GGCCNNNN↓NGGCC) ubicados en ambos extremos del nanobody. Dado que los nucleótidos variables (NNNNN) en los sitios de reconocimiento son diferentes en 5' y 3', el uso de esta enzima facilita el clonado direccional. El cassette de expresión resultante incluye en el extremo amino-terminal al nanobody, seguido de una cola de poli-histidina (6xHis), el péptido HA (un epítipo de la proteína viral hemaglutinina) y la proteína pIII del fago.

2.2 Vectores pINQ

Los vectores pINQ-H6HA[132], pINQ-BtH6[133] y pINQ-NanoLuc son vectores derivados del vector pET-28a(+) (Novagen), y como tales poseen el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección. Son utilizados para la expresión de nanobodies: los dos primeros resultan en nanobodies expresados con diferentes tags, mientras que pINQ-NanoLuc permite la expresión de quimeras de nanobodies con esta enzima luciferasa. Todos estos vectores presentan los mismos sitios de restricción para la enzima SfiI que el vector pComb3X, facilitando el subclonado de nanobodies.

Estos vectores permiten la expresión inducible de la proteína recombinante, evitando que su posible toxicidad afecte el crecimiento del cultivo. Dicha expresión se encuentra bajo el control del promotor T7, reconocido por la ARN polimerasa del bacteriófago T7, por lo que estos vectores deben transformarse en una cepa que codifique esta polimerasa en su genoma, como *E. coli* BL21(DE3). Dado que tanto la proteína recombinante de interés como la ARN polimerasa

T7 se encuentran bajo el control del operador lac, la expresión de ambas es inducible mediante el agregado de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Asimismo, los vectores pINQ permiten expresar los nanobodies en tándem a secuencias peptídicas adicionales. La secuencia OmpA, posicionada en el extremo amino-terminal de la secuencia traducida, codifica un péptido señal que promueve la localización de la proteína en el espacio periplasmático, donde el ambiente oxidativo favorece la formación de los enlaces disulfuro que forman parte de la estructura de los nanobodies. Por otra parte, pINQ-H6HA incorpora en el extremo carboxilo-terminal un tag 6xHis y el péptido HA, mientras que pINQ-BtH6 incorpora 6xHis y el péptido AviTag, reconocido por la enzima biotina ligasa BirA, que añade una molécula de biotina en forma sitio-específica sobre el residuo de lisina de este péptido. Finalmente, pINQ-NanoLuc permite la expresión del nanobody en tándem a 6xHis y a la luciferasa NanoLuc.

Para la biotilación de nanobodies, el vector pINQ-BtH6 debe ser transformado en la cepa *E. coli* BL21(DE3)-pBir, que sobre-expresa la enzima BirA a partir del vector pCY216, el cual presenta resistencia a cloranfenicol como marcador de selección y cuya expresión es inducible mediante el agregado de arabinosa. La co-expresión de BirA y el nanobody de interés permite que la biotilación tenga lugar *in vivo*, aunque con baja eficiencia. Para aumentar esta eficiencia se puede realizar una etapa de biotilación *in vitro*, denominada post-biotilación[133], que consiste en la incubación a 37 °C del extracto celular en presencia de un exceso de biotina para promover la biotilación de la totalidad del nanobody.

2.3 pcDNA3.1(+)

pcDNA3.1(+) (Invitrogen) es un vector para la expresión de proteínas recombinantes en células de mamíferos. Posee un origen de replicación pUC y un gen de resistencia a ampicilina para su propagación en bacterias. Asimismo, posee un origen para la replicación episomal en células que expresan el antígeno T grande del virus SV-40, como por ejemplo la línea celular HEK293T. La presencia de un promotor y potenciador derivados de citomegalovirus promueven un alto nivel de expresión de la proteína recombinante.

En el marco de esta tesis, se diseñó un gen para la expresión de quimeras nanobody-NanoLuc fusionadas al Twin-Strep-tag, que fue incorporado en este vector. En esta construcción, la secuencia del nanobody se encontraba flanqueada por los mismos sitios de restricción de Sfil que el resto de los vectores mencionados.

3. Subclonado de nanobodies

El subclonado de nanobodies se realizó mediante la obtención de un inserto digerido a través de sitios de restricción asimétricos reconocidos por la enzima Sfil, y su ligación en forma direccional en un vector de destino digerido que presentara extremos cohesivos. La obtención del inserto fue diferente para el clonado de nanobodies individuales o un pool de genes de nanobodies.

Para el subclonado de nanobodies individuales, se realizó la amplificación por PCR de la secuencia codificante del nanobody (según se describe en la sección 1.5) utilizando el cebador directo "5" (5'-GTTACTCGCGGCCAGGCGCCATG-3') y el cebador reverso "6" (5'-CCACGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAG-3'). Estos cebadores se hibridan a los sitios de restricción asimétricos de SfiI, permitiendo la amplificación del nanobody de interés y al mismo tiempo proporcionando los sitios para una posterior digestión utilizando esta enzima. Los productos de PCR fueron purificados mediante gel de agarosa utilizando el kit comercial Qiaquick Gel Extraction (Qiagen) y posteriormente digeridos con SfiI (Thermo Fisher Scientific #ER1821) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El producto de digestión fue purificado mediante el kit comercial Qiaquick PCR Purification (Qiagen #28104).

En el caso del subclonado de pools de genes de nanobodies en vectores de expresión para la realización de screenings high-throughput, en lugar de amplificación por PCR se realizó una digestión de ~10 µg del vector de partida con la enzima de restricción SfiI, y el inserto liberado fue purificado mediante gel de agarosa utilizando el kit comercial Qiaquick Gel Extraction (Qiagen).

Los vectores de destino se obtuvieron mediante la digestión de ~10 µg de plásmido con SfiI, seguido de una purificación mediante gel de agarosa en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las ligaciones se realizaron con la enzima T4 ligasa (Thermo Fisher Scientific #EL0011) utilizando una relación molar 1:3 vector:inserto. En el caso de clones individuales, los productos de ligación fueron transformados en células *E. coli* DH5-α y plaqueados en placas de LB agar-kanamicina. Se obtuvo el ADN plasmídico de colonias aisladas y el clonado se verificó mediante secuenciación como se describe en la sección 1.3. Por otro lado, en el caso del clonado de pools de genes de nanobodies los productos de ligación fueron transformados en células *E. coli* BL21(DE3) para su expresión.

4. Caracterización de la quimera NbA2-NanoLuc

Para explorar algunos aspectos generales del trabajo con la enzima NanoLuc se utilizó como modelo el nanobody A2 anti-microcistina, para lo cual se produjo la quimera NbA2-NanoLuc.

4.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La quimera producida fue analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, con el equipo Microflex (Bruker). Se utilizó como matriz ácido sinapínico 10 mg/mL en una mezcla 50:50 de acetonitrilo:TFA 0,1%.

4.2 Titulación del NbA2 anti-microcistina

Para evaluar la reactividad del nanobody en la quimera, se realizó en paralelo la titulación del mismo y del NbA2 biotinilado. Los nanobodies fueron titulados incubando diluciones seriadas sobre pocillos de ELISA sensibilizados con BSA-microcistina 60 ng/mL y bloqueados con PBS-BSA 1%. El ensayo colorimétrico fue revelado luego de una incubación con una dilución 1/10000 de estreptavidina conjugada a peroxidasa (Thermo Fisher Scientific #S911).

4.3 ELISA de competencia para la detección de microcistina

Este ELISA fue llevado a cabo en las condiciones previamente optimizadas en nuestro laboratorio por la Dra. Macarena Pérez. Se sensibilizaron pocillos de ELISA con BSA-microcistina 60 ng/mL y se bloquearon con PBS-BSA 1%. En una placa de dilución, se realizaron diluciones seriadas de microcistina en PBS por triplicado, en un volumen de 100 μ L/pocillo. Sobre esta placa se agregaron 100 μ L/pocillo de una solución en PBS de NbA2-NanoLuc 7 ng/mL, y luego de homogenizar esta mezcla se transfirieron 100 μ L/pocillo de la misma a la placa de ELISA. Esto se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se procedió al revelado del ensayo.

5. Ensayo de actividad enzimática NanoLuc

Para determinar la actividad enzimática de NanoLuc en las quimeras producidas, se utilizaron placas de ELISA blancas bloqueadas con PBS-BSA 1% para evitar la adsorción de las quimeras. Se dispensaron 50 μ L por pocillo de una solución de la quimera en PBS, y en el caso de medidas de actividad en extractos celulares se utilizó una dilución 1/5000 en PBS de los mismos. Finalmente se dispensaron 50 μ L por pocillo del sustrato de NanoLuc y se procedió a la medida como se describe en la sección 1.4.

6. Producción recombinante de proteína N

La proteína de nucleocápside de SARS-CoV-2, así como la proteína N Δ 121 (una versión truncada en el extremo amino-terminal que carece de los primeros 121 residuos) fueron clonadas en el vector de expresión pET-28a(+). La proteína N estaba asociada al Strep-tag en el extremo carboxilo-terminal, mientras que N Δ 121 estaba asociada a un tag 6xHis y al péptido AviTag (el cual permite la biotilación sitio-específica a través de la enzima biotina ligasa BirA de *E. coli*, como se describió en el punto 2.2). Los plásmidos fueron electroporados en *E. coli* BL21(DE3) o *E. coli* BL21(DE3)-pBir respectivamente. Se tomó en cada caso una colonia aislada para realizar un cultivo ON en 2 mL de LB-kanamicina, que fue utilizado para inocular en cada caso un matraz de 200 mL de LB-kanamicina (en el caso de las células *E. coli* BL21(DE3)-pBir se suplementó el cultivo además con biotina 100 μ M, cloranfenicol 35 μ g/mL, y arabinosa 0,04% para inducir la expresión de BirA). Al alcanzarse una $DO_{600\text{ nm}} = 0,6$ UA, los cultivos fueron inducidos mediante el agregado de IPTG 10 μ M e incubados ON a 28 °C.

Al día siguiente se obtuvieron las células por centrifugación a 5000g durante 10 minutos a 4 °C y fueron resuspendidas en buffer Tris 50 mM con NaCl 500 mM, PMSF 1 mM y ARNasa A 10 μ g/mL, pH 7,5, suplementado con EDTA 1 mM en el caso de la proteína N de longitud completa. Las células fueron lisadas mediante sonicación. Al lisado celular de N Δ 121 se le adicionó biotina 1 mM y fue incubado durante 2 horas a 37 °C (etapa de post-biotilación). Los lisados celulares fueron centrifugados a 30000g durante 20 minutos, y las proteínas de interés fueron purificadas a partir de los sobrenadantes. Para la proteína N se utilizó una columna StrepTrap XT (Cytiva #29401320), que presenta una proteína específica por el Strep-tag, mientras que N Δ 121 fue purificada mediante una columna de Ni-NTA (Cytiva #17524701), en

cada caso de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para las purificaciones en columna se utilizó el equipo de purificación ÄKTA (GE Healthcare) y se monitoreó la presencia de proteína en forma continua a través de medidas de absorbancia a 280 nm. Luego de la elución, se realizó un cambio de buffer de las proteínas mediante columnas NAP-25 (Cytiva #10004064) al buffer Tris 50 mM, NaCl 500 mM, glicerol 5%, trehalosa 11%, pH 8,0. Finalmente fueron alícuotadas y almacenadas a -20 °C.

7. Inmunización de una llama y construcción de bibliotecas de fagos filamentosos

Por motivos que serán discutidos en la sección Resultados y Discusión 3.1, se construyeron dos bibliotecas de fagos filamentosos durante el transcurso de esta tesis, para seleccionar clones anti-proteína N y anti-IgE respectivamente. En ambos casos se inmunizó la misma llama de 3 años del Parque Lecocq. Para la primera biblioteca, se administraron 3 dosis de proteína N recombinante y 2 dosis de IgE humana monoclonal (Aviva Systems Biology, #OPEF01415), con 500 µg de cada antígeno por dosis. Las dosis fueron administradas por vía subcutánea en adyuvante incompleto de Freund cada 15 días. Para la segunda biblioteca, luego de aproximadamente un año se administraron 3 dosis adicionales de IgE humana siguiendo el mismo protocolo. Los procesos de inmunización fueron evaluados siguiendo la evolución del título de anticuerpos de cadena pesada mediante ELISA, como se describe en el punto 1.4.

Para la construcción de las bibliotecas, se extrajeron 200 mL de sangre 10 días después de la última dosis, y se purificaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente utilizando Lymphocyte Separation Media (densidad 1.077 g/mL) (Capricorn Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas fueron generadas a partir de 6×10^7 y 2×10^7 células respectivamente, de las cuales se extrajo el ARN utilizando el reactivo TRIzol (Thermo Fisher Scientific #15596026) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El ARN fue retro-transcripto utilizando la retrotranscriptasa RevertAID (Thermo Fisher Scientific #EP0442) y dos cebadores específicos contra la región bisagra de los anticuerpos de cadena pesada: INQ-H2 (5'-GGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGGTT-3') y INQ-H3 (5'-GAGCTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3'). Estos cebadores permiten la retro-transcripción de dominios variables asociados a HcAbs (en su mayoría dominios VHH, ocasionalmente dominios VH asociados a HcAbs). Los fragmentos génicos correspondientes a estos dominios fueron amplificados desde el ADNc obtenido utilizando los cebadores directos VH1 (5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGGCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG-3'), VH3 (5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGGCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3'), VH4 (5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGGCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG-3') y VH4 Arg (5'-CGTGGATTGTTATTATCTGCGGCCAGGCGGCCATGGCCGATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG-3') y el cebador reverso JH (5'-CCACGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACRGTGACCTGGGTCC-3'). El protocolo de amplificación fue el descrito en la sección 1.5, pero en este caso se realizaron 25 ciclos de

amplificación. Los amplicones fueron purificados mediante gel de agarosa, digeridos con la enzima de restricción Sfil (a través de los sitios de restricción incorporados por los cebadores) y clonados en el vector fagémido pComb3X.

A continuación, 2 µg del vector resultante fueron electroporados en células *E. coli* ER2738. Luego de una incubación en medio SOC (15 mL) durante 1 hora a 37 °C, 250 rpm, se tomó una alícuota de 500 µL a partir de la cual se plaquearon diferentes diluciones en placas de LB agar-ampicilina para determinar la diversidad de la biblioteca. El resto del cultivo fue diluido en 30 mL de medio SB (triptona 30 g/L, extracto de levadura 20 g/L y MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 10 g/L, pH 7,0) suplementado con ampicilina para una concentración final de 40 µL. Luego de una 1 hora de cultivo, se agregó ampicilina para una concentración final de 100 µg/mL y se incubó 1 hora más. El cultivo fue diluido en 250 mL SB-ampicilina (manteniendo la concentración de 100 µg/mL) y se infectó con fago helper M13KO7 (7×10^7 ufc). Luego de 90 minutos de cultivo, se agregó kanamicina (50 µg/mL) y el cultivo se incubó ON en las mismas condiciones.

Al día siguiente, el sobrenadante de cultivo fue obtenido por centrifugación a 12000g durante 15 minutos a 4 °C. Las partículas de fagos fueron precipitadas mediante el agregado de 0,2 volúmenes de polietilenglicol 8000 (PEG 8000) 20%-NaCl 2,5 M, e incubadas en hielo durante 1 hora. Luego de una centrifugación a 15000g durante 20 minutos a 4 °C, los fagos fueron resuspendidos en 30 mL de PBS. Para alcanzar una mayor pureza, los fagos fueron precipitados nuevamente de la misma forma, y luego de la centrifugación fueron resuspendidos en 5 mL de una solución conservadora compuesta por PBS suplementado con BSA 3%, glicerol 10%, Tween 20 0,3%, arginina 120 mM y el cóctel de inhibidores de proteasas cOmplete (Roche #11697498001). Se realizó una centrifugación final a 10000g durante 5 minutos a 4 °C para eliminar posibles células que hayan permanecido luego de la centrifugación inicial. Finalmente, las bibliotecas fueron alicuotadas y almacenadas a -80 °C.

7.1 Titulación de anticuerpos de cadena pesada en sueros de llama

Para la titulación de anticuerpos anti-proteína N y anti-IgE humana se realizaron ensayos ELISA según se describe en la sección 1.4, utilizando placas sensibilizadas ON a 4 °C con proteína N recombinante 4 µg/mL o IgE humana (Aviva Systems Biology, #OPEF01415) 2 µg/mL y bloqueadas con PBS-leche 5%. Se incubaron diluciones seriadas de sueros de llama en PBS-leche 1% y para el revelado se incubó una dilución 1/10000 de un anticuerpo monoclonal anti-VHH conjugado a peroxidasa (Genscript #A01861) en PBS-leche 1%-Tween 20 0,05%. Para el análisis de resultados, se realizaron ajustes sigmoides mediante GraphPad Prism 8.

Como control, los sueros también fueron evaluados para confirmar que no fueran reactivos contra el bloqueante utilizado.

8. Selección de nanobodies mediante panning

El proceso de panning se realizó en cuatro pocillos de ELISA de alta adherencia sensibilizados con proteína N 1 µg/mL o IgE humana policlonal (Athens Research & Technology, #16-16-

090705) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y bloqueados con PBS-BSA 1%. Se realizaron 4 lavados con PBS-T y a continuación se agregaron 1×10^{10} ufc por pocillo de la biblioteca de fagos en un volumen final de 100 μL , realizando la dilución en PBS-BSA 1%, y fueron incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Los fagos no unidos fueron descartados y se realizaron 10 lavados con PBS-T, a continuación se incubó la placa con este buffer durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se realizaron 10 lavados más. Los fagos fueron eluidos agregando 50 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de tripsina 10 mg/mL (Sigma-Aldrich, #T4799) en buffer Tris salino (Tris 50 mM , NaCl 150 mM , pH 7,5) e incubando durante 30 minutos a 37 °C.

Para la selección de clones anti-proteína N, se realizaron tres rondas de panning. Para la tercera ronda, se implementaron dos estrategias en paralelo, por un lado una estrategia igual a las rondas anteriores (estrategia no-competitiva) y por otro una estrategia con una etapa de competencia antes de la elución, en la cual los fagos unidos fueron incubados con 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de proteína N 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ON a 4 °C. Esta estrategia tiene como objetivo promover la selección de clones de constante cinética de disociación (k_{off}) lenta, dado que los clones de k_{off} rápida que en algún punto se disocian del antígeno inmovilizado serán capturados por el antígeno en exceso en solución.

Para la selección de nanobodies anti-IgE, se llevaron a cabo dos instancias de panning. En primer lugar, se aplicó una estrategia convencional, como la descrita anteriormente. En una segunda instancia, orientada a la selección de clones de detección a utilizar en un ELISA sándwich, se utilizó como molécula selectora el inmunocomplejo formado por un nanobody de captura previamente seleccionado (clon #3) e IgE. En este caso, los pocillos de ELISA fueron sensibilizados con estreptavidina 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y luego del bloqueo fueron incubados con nanobody #3 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seguido de IgE 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, antes de proceder a la incubación con la biblioteca. Se realizaron dos rondas para cada una de las instancias de panning.

En cada etapa de panning para la selección de clones anti-IgE, se realizó una pre-adsorción de la biblioteca incubándola sobre pocillos sensibilizados con una solución de las inmunoglobulinas humanas IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA (1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada una) (Athens Research & Technology), con el objetivo de excluir aquellos clones que pudieran dar lugar a reactividad cruzada. La biblioteca fue incubada 1 hora a temperatura ambiente, y posteriormente fue recuperada para proceder con el panning. Al realizar la incubación sobre los pocillos sensibilizados con IgE, se co-incubó con las mismas inmunoglobulinas humanas, a una concentración de 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cada una.

8.1 Amplificación de fagos

La fracción de fagos eluidos (output) debe ser amplificada para someterse a una nueva ronda de panning. Para la amplificación de fagos, se infectó una alícuota de 2 mL de un cultivo de bacterias *E. coli* ER2738 en medio SB-tetraciclina ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,8-1$ UA) con 100 μL del output durante 20 minutos a 37 °C. Las células infectadas fueron diluidas en 6 mL de SB suplementado con ampicilina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y crecidas durante 1 hora a 37 °C. A continuación se agregó ampicilina para alcanzar una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se continuó la incubación en las mismas condiciones durante 1 hora, luego de lo cual se realizó una nueva dilución, esta vez en 12 mL de SB-ampicilina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se añadieron 50 μL de fago helper M13KO7 (multiplicidad de

infección fago:célula aproximadamente 10:1). Se incubó nuevamente en las mismas condiciones durante 2 horas. Finalmente, se suplementó el medio con kanamicina 56 µg/mL y se incubó el cultivo ON.

Al día siguiente, el sobrenadante de cultivo fue recuperado mediante centrifugación a 12000g durante 15 minutos a 4 °C. A partir del mismo, los fagos fueron precipitados agregando 0,2 volúmenes de PEG 8000 20% e incubando en hielo durante 1 hora. Los fagos precipitados fueron obtenidos mediante centrifugación en las mismas condiciones y resuspendidos en 1 mL de PBS-BSA 1%. Finalmente, los fagos fueron sometidos a una centrifugación a 17000g durante 1 minuto para separar posibles células que hayan permanecido luego de la centrifugación inicial.

En rondas sucesivas de panning, se agrega a los pocillos 100 µL de este amplificado en lugar de la biblioteca de fagos.

8.2 Titulación de fagos

Para evaluar y controlar el proceso de panning, los fagos obtenidos (outputs y amplificados) deben ser titulados. Para la titulación, se infectaron alícuotas de 100 µL de un cultivo de bacterias *E. coli* ER2738 en medio SB-tetraciclina ($DO_{600nm} = 0,8-1$ UA) con 10 µL de diluciones seriadas de una solución de fagos (output o amplificado) en medio SB. Luego de una incubación de 30 minutos a 37 °C sin agitación, las alícuotas fueron plaqueadas en placas de LB agar-ampicilina e incubadas ON. Dado que el vector fagémido confiere resistencia a ampicilina, el recuento de colonias permite cuantificar los fagos presentes en un output o amplificado (como unidades formadoras de colonias, ufc).

8.3 Screening preliminar del output de fagos

Para realizar una evaluación primaria de un output obtenido, se inocularon cultivos de 2 mL en medio SB-ampicilina con entre 10 y 12 colonias aisladas de una placa de titulación del output a evaluar, las cuales contenían el vector fagémido pComb3X. Al alcanzar una $DO_{600nm} = 0,6$ UA la expresión de nanobodies fue inducida mediante el agregado de IPTG 1 mM y los cultivos fueron crecidos ON a 37 °C.

Al día siguiente los sobrenadantes de cultivo fueron obtenidos mediante centrifugación a 5000g durante 10 minutos a 4 °C y analizados mediante ELISA. Se incubaron diluciones 1/2 de los sobrenadantes sobre pocillos sensibilizados con el antígeno de interés y bloqueados con PBS-BSA 1%, y la unión de los nanobodies fue detectada utilizando una dilución 1/3000 de un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (Roche #12013819001).

Para el screening de nanobodies anti-proteína N, se evaluó la reactividad tanto contra proteína N como NΔ121. En el caso de la primera, los pocillos fueron sensibilizados con proteína N 1 µg/mL, mientras que en el caso de la proteína NΔ121 los pocillos fueron sensibilizados con estreptavidina 2 µg/mL, y luego del bloqueo se incubó proteína NΔ121 biotinilada 1 µg/mL. Para el screening de clones anti-IgE, las placas fueron sensibilizadas con IgE humana policlonal 2 µg/mL. Para evaluar la reactividad cruzada se sensibilizaron pocillos con otras inmunoglobulinas humanas a la misma concentración.

8.4 Obtención del vector fagémido a partir de un output de fagos

Para realizar el subclonado hacia otro vector del pool de genes de nanobodies de un output, se obtuvo el vector fagémido a partir de un cultivo de células infectadas por el output. Para ello, una alícuota de 500 μL de cultivo de bacterias *E. coli* ER2738 en medio SB-tetraciclina ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,8-1$ UA) fue infectada con 50 μL de output mediante una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, este cultivo fue diluido en 9,5 mL de medio SB suplementado con ampicilina 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Luego de 40 minutos de cultivo, se agregó ampicilina para una concentración final de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se cultivó ON. Al día siguiente, el ADN plasmídico fue obtenido utilizando el kit comercial Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen #27104).

9. Expresión recombinante de nanobodies

9.1 Expresión high-throughput y screening de nanobodies

El screening high-throughput de nanobodies anti-proteína N fue realizado mediante la expresión de clones utilizando el vector pINQ-H6HA, mientras que para la selección de nanobodies anti-IgE los clones fueron expresados utilizando el vector pINQ-NanoLuc. El clonado fue realizado según se describe en la sección 3.

Aproximadamente 90 colonias aisladas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con vector de expresión fueron utilizadas para inocular cultivos ON en un bloque de cultivo de 96 pocillos (Greiner Bio-One #780201) con 500 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de medio LB-kanamicina suplementado con glucosa 4%. Al día siguiente, un bloque similar con medio LB-kanamicina fue inoculado con 5 μL por pocillo (dilución 1/100) de este cultivo ON. (Como respaldo, el resto del cultivo ON fue almacenado a -80 °C con glicerol 15%.) La expresión de los nanobodies se indujo a $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$ UA con IPTG 10 μM , y el cultivo se incubó ON a 28 °C. Al día siguiente, los pellets fueron obtenidos mediante centrifugación a 1200g durante 30 minutos a 4 °C, resuspendidos en 200 μL de PBS y lisados mediante cuatro ciclos de congelado/descongelado seguidos de 30 minutos de sonicación en baño. Los lisados celulares fueron centrifugados en las mismas condiciones, y los sobrenadantes fueron evaluados mediante ELISA.

En el caso del screening anti-proteína N, el ELISA se llevó a cabo como se describió en el punto 8.3, incubando diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 de los extractos. Por otra parte, para el screening anti-IgE se utilizaron placas de ELISA en que el antígeno fue capturado por el nanobody #3. Para ello, se utilizaron placas sensibilizadas con estreptavidina 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, bloqueadas con caseína 1% y Tween 20 0,05% en buffer carbonato (carbonato 50 mM, pH 9,6), incubadas con nanobody #3 biotinilado 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y posteriormente con IgE 10 ng/mL. En este caso, los clones para el screening fueron expresados como quimeras nanobody-NanoLuc. Los extractos celulares conteniendo las quimeras fueron incubados en una dilución 1/100 y posteriormente el ensayo fue revelado mediante el agregado del sustrato de NanoLuc.

9.2 Expresión recombinante de nanobodies seleccionados en *E. coli*

La expresión de nanobodies y quimeras nanobody-NanoLuc se realizó en bacterias *E. coli* BL21(DE3) utilizando los vectores pINQ; en particular, la expresión de clones utilizando el

vector pINQ-BtH6 se realizó en bacterias *E. coli* BL21(DE3)-pBir. Los cultivos celulares y la biotilación sitio-específica fueron realizados como se describió anteriormente para las proteínas N y NΔ121 (sección 6).

Para optimizar la expresión de cada clon, se realizaron cultivos a pequeña escala (5 mL) evaluando diferentes concentraciones de inductor, temperaturas de cultivo, y en algunos casos medios de cultivo. Los cultivos en medio LB y TB fueron inducidos a $DO_{600nm} = 0,6$ UA y $DO_{600nm} = 1,0$ UA respectivamente. Al día siguiente, para generar extractos celulares se centrifugó 1 mL de cada cultivo a 5000g durante 10 minutos, y se resuspendió en 200 μ L del reactivo de lisis celular B-PER (Thermo Fisher Scientific #78243). El mismo se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 15000g durante 5 minutos. Luego de separar el sobrenadante (correspondiente a la fracción soluble del extracto) el pellet fue resuspendido en 200 μ L de urea 8 M, incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugado a 17000g durante 10 minutos para obtener la fracción insoluble del extracto (correspondiente al sobrenadante de esta centrifugación). Las fracciones fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE.

Los cultivos a mayor escala (250-500 mL) fueron inducidos y crecidos ON a 20 o 28 °C, luego de lo cual las células fueron obtenidas mediante centrifugación a 5000g durante 10 minutos a 4 °C. Para los cultivos de nanobodies biotilados, las células fueron lisadas mediante sonicación, un método que permite el lisado total de las células. Esto se debe a que los nanobodies, que son exportados al espacio periplasmático, deben ponerse en contacto con la enzima biotina ligasa BirA, expresada en el citoplasma. Para el resto de las construcciones, las células fueron lisadas mediante shock osmótico, un método de lisis que permite obtener un extracto periplasmático.

Para el primer caso, las células fueron resuspendidas en PBS (0,05 veces el volumen de cultivo inicial) y lisadas mediante sonicación. Para el segundo caso, el protocolo de lisis se basó en el reportado por Olichon, A. *et al*[134]. Por cada 250 mL de cultivo, las células fueron resuspendidas en 2,5 mL de buffer TES (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 0,5 mM y sacarosa 0,5 M, pH 8,0). La suspensión fue congelada a -80 °C y descongelada en hielo, posteriormente se le agregaron 2,5 mL de buffer TES y fue incubada en hielo durante 30 minutos. El paso final de la lisis consistió en inducir el shock osmótico suplementando la suspensión celular con 7,5 mL de una dilución 1/5 de buffer TES en agua e incubando en hielo durante 30 minutos.

En ambos casos, la fracción soluble de los extractos fue obtenida mediante centrifugación a 30000g durante 20 minutos a 4 °C, y suplementada con NaCl 300 mM e imidazol 20 mM. Para la purificación de los nanobodies y quimeras se utilizó el equipo ÄKTA y columnas de Ni-NTA (buffer de equilibrio: fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8,0), y fueron eluidos con un buffer conteniendo imidazol 250 mM (buffer de elución: fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0). Finalmente, fueron dializados en PBS utilizando membranas de cutoff de 13 kDa (Sigma-Aldrich), alicuotados y almacenados a -20 °C.

9.2.1 Screening de condiciones de re-plegamiento de la quimera NbON10-NanoLuc

Dado que la quimera NbON10-NanoLuc no pudo ser recuperada en la fracción soluble de cultivos de *E. coli*, se exploró su re-plegamiento a partir de cuerpos de inclusión. Para ello, se

realizó la expresión de esta quimera en 400 mL de medio TB. Las células fueron lisadas por sonicación, y luego de centrifugar el lisado a 30000g durante 20 minutos los cuerpos de inclusión fueron purificados a partir del pellet. Se realizó un primer lavado resuspendiendo el pellet en 30 mL de buffer Tris 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, tritón X-100 1%, pH 8,0, seguido de centrifugación a 30000g durante 20 minutos, y un segundo lavado resuspendiendo en 30 mL de agua milliQ, seguido de centrifugación en las mismas condiciones. A continuación, para la solubilización de los cuerpos de inclusión el pellet fue resuspendido en 10 mL de buffer Tris 60 mM, NaCl 300 mM, urea 6 M, pH 10,0. Luego de una centrifugación final en iguales condiciones, la proteína solubilizada fue recuperada en el sobrenadante, cuantificada midiendo su absorbancia a 280 nm y visualizada mediante SDS-PAGE.

El protocolo de re-plegamiento se basó en el reportado por Carlomagno *et al*[135]. Se evaluaron 84 condiciones diferentes, generadas combinando buffers en un rango de pH 5-11 y aditivos en diferentes concentraciones. Los buffers preparados fueron acetato 200 mM, pH 5,0; fosfato 100 mM, pH 6,0; fosfato 100 mM, pH 7,0; Tris 200 mM, pH 8,0; Tris 200 mM, pH 8,5; Tris 200 mM, pH 9,0; y carbonato 200 mM, pH 11,0; y los aditivos arginina 0,4, 1,0 y 2,0 M, sacarosa 0,4, 1,0 y 2,0 M, glicerol 8%, 26% y 80%, y PEG 10%, 20% y 40%. Se combinaron en una placa de dilución 100 μ L de cada buffer con 100 μ L de cada uno de los aditivos y se añadieron 10 μ L/pocillo de la quimera solubilizada. Luego de 1 minuto de incubación en agitación, la eficiencia de re-plegamiento para cada condición fue evaluada midiendo la actividad de NanoLuc como se describe en la sección 5. Como referencia, se realizaron en paralelo medidas de actividad del NbA2-NanoLuc previamente producido.

9.3 Expresión recombinante de la quimera NbON10-NanoLuc en células HEK293T

El clon ON10 fue clonado en tándem a la luciferasa NanoLuc en el vector pcDNA3.1(+), que permite la expresión transitoria en HEK293T. En este vector, el cassette de expresión contiene la secuencia líder Ig κ para la secreción de la proteína, las secuencias codificantes del nanobody seguido de la enzima NanoLuc y el Twin-Strep-tag (compuesto por dos repetidos en tándem del Strep-tag, presentando una mayor avidéz por las columnas StrepTrap XT). Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (4,5 g/L)) (Capricorn Scientific) suplementado con suero fetal bovino 10% (Capricorn Scientific) y una solución de antibiótico-antimicótico (Thermo Fisher Scientific #15240062), a 37 °C y CO₂ 5%. Se transfectaron cultivos celulares de aproximadamente 80% de confluencia utilizando PEI MAX (Polysciences #24765-100). Se evaluaron distintas relaciones masa:masa de PEI:ADN, realizándose finalmente la transfección a gran escala utilizando una relación 5:1. Luego de 4 días, el sobrenadante del medio de cultivo fue obtenido por centrifugación a 300g durante 10 minutos a 4 °C y la proteína fue purificada utilizando una columna StrepTrap XT de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

10. Determinación de constantes de afinidad (K_D) y binning de epítopes de nanobodies

La unión de nanobodies a proteína N e IgE fue caracterizada mediante interferometría de biocapa utilizando el equipo BLItz (ForteBio) y biosensores reactivos a aminas (biosensores

AR2G). Los biosensores fueron activados con N-hidroxisuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), luego de lo cual se inmovilizó el antígeno (proteína N 39 µg/mL o IgE 30 µg/mL) en buffer acetato 10 mM pH 5,0 y finalmente se bloquearon los sensores con etanolamina 1 M, pH 8,5.

Para la determinación de constantes de disociación (K_D), se estableció la línea de base utilizando 400 µL de kinetic buffer 10X (PBS suplementado con Tween 20 0,2%, BSA 1% y azida de sodio 0,05%)¹. La cinética de asociación de los nanobodies se midió incubando el sensor sobre una gota de 4 µL de nanobody en diferentes concentraciones en kinetic buffer 10X durante 120 o 300 s, mientras que la disociación se monitoreó colocando el sensor en 400 µL de kinetic buffer 10X durante 120 o 300 s. Para los nanobodies anti-proteína N se realizaron medidas a concentraciones de 10, 25, 50, 100, 200 y 400 nM, mientras que para los nanobodies anti-IgE, dado que las medidas de K_D realizadas fueron aproximadas, se utilizó una única concentración, de 100 o 400 nM según el caso. Todas las etapas fueron realizadas con agitación a 2200 rpm. Se realizó un ajuste de los datos mediante el software Blitz Pro (versión 1.2) utilizando un modelo de unión 1:1, a partir del cual se calcularon los parámetros cinéticos.

Por otra parte, se realizó un binning de epítopes para determinar si distintos clones poseían epítopes solapantes. Cada clon fue incubado consecutivamente durante 120 s a una concentración de 100 µg/mL, con agitación a 2200 rpm. En la solución de cada nuevo clon se incluyeron todos los clones unidos previamente, para compensar el potencial desplazamiento de los clones ya unidos.

11. ELISA en formato sándwich para la detección de proteína N e IgE

Los ensayos ELISA fueron realizados según el protocolo general descrito en el punto 1.4. Se sensibilizaron pocillos de ELISA con estreptavidina 4 µg/mL, se bloquearon con caseína 1% y Tween 20 0,05% en buffer carbonato y a continuación fueron incubados con nanobody de captura biotinilado 2 µg/mL.

Para la detección de proteína N, las curvas de titulación fueron realizadas incubando diluciones seriadas de la proteína en el medio de transporte viral (VTM) de la empresa ATGen, mientras que las muestras de hisopado nasofaríngeo, colectadas en VTM, fueron incubadas sin diluir. En el caso del ensayo colorimétrico, la proteína N fue detectada mediante el agregado de nanobody-HA 5 µg/mL seguido de una dilución 1/3000 de anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (Roche #12013819001), revelando el ensayo con el sustrato TMB. Por otra parte, en el ensayo luminiscente la proteína fue detectada mediante el agregado de la quimera NbON10-NanoLuc 5 µg/mL, revelando el ensayo con el sustrato furimazina.

Para la detección de IgE, se realizaron curvas de titulación incubando diluciones seriadas de esta proteína en el diluyente utilizado para el ensayo. Los ensayos fueron revelados con

¹ Si bien este buffer es recomendado por el fabricante del equipo para ser usado a concentración final 1X, durante experiencias previas en nuestro laboratorio se obtuvieron mejores resultados utilizando este buffer a concentración final 10X (sin diluir).

quimeras nanobody-NanoLuc de diferentes clones a una concentración de 2 µg/mL, finalmente revelando el ensayo con el agregado del sustrato furimazina.

En todos los casos se realizaron ajustes lineales mediante GraphPad Prism 8.

11.1 Muestras clínicas analizadas

Para evaluar el ensayo de detección de proteína N desarrollado, se utilizaron muestras de hisopado nasofaríngeo colectadas en VTM y analizadas mediante RT-qPCR por la empresa ATGen. Las muestras analizadas en el marco de esta tesis fueron muestras remanentes y anonimizadas mediante codificación.

Por motivos de seguridad, se agregó a las muestras tritón X-100 a concentración final 0,5% para asegurar la inactivación del virus[136], y las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso. Inicialmente se obtuvieron n=19 muestras positivas y n=10 muestras negativas en febrero de 2022, un momento en que Omicron había pasado a ser la variante dominante en Uruguay, representando casi el 100% de los nuevos casos ese mes[137]. Estas muestras fueron utilizadas para realizar una comparación de los ensayos colorimétrico y luminescente. Posteriormente, n=47 muestras positivas y n=68 muestras negativas fueron obtenidas en marzo y abril de 2022, las cuales fueron utilizadas para realizar una evaluación más rigurosa del ensayo luminescente. Omicron continuaba siendo la variante dominante en este momento. Algunas muestras adicionales fueron obtenidas previamente, las cuales fueron utilizadas en la etapa de optimización del ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1: Exploración del uso de NanoLuc como enzima reportera fusionada a un nanobody modelo anti-microcistina

La presente tesis comenzó con la exploración de algunos aspectos generales del trabajo con la enzima luciferasa NanoLuc para su aplicación al desarrollo de inmunoensayos. Para ello se trabajó con un nanobody modelo: el clon A2 anti-microcistina (NbA2), seleccionado en 2017 por la Dra. Macarena Pérez e implementado en un ensayo colorimétrico para la cuantificación de microcistinas[138]. Las microcistinas son una clase de toxinas producidas por varias especies de cianobacterias. Estructuralmente, son heptapéptidos cíclicos sintetizados por enzimas no ribosomales, con un peso molecular de alrededor de 1 kDa, por lo cual en el contexto de la obtención de anticuerpos específicos se comportan como haptenos. El nanobody A2 fue seleccionado contra la microcistina-LR, la más común y la más tóxica de las variantes de microcistina, pero presenta reactividad cruzada con otras microcistinas. Para el trabajo con este clon, se contaba tanto con soluciones de la toxina como con un conjugado BSA-microcistina.

1.1 Expresión recombinante de NbA2-NanoLuc

Para comenzar, se exploró la expresión en *E. coli* de la quimera NbA2-NanoLuc. Para ello se construyó el vector pINQ-NanoLuc (**figura 8**), que permite la expresión de un nanobody en tándem con esta luciferasa en forma inducible mediante el agregado de IPTG. El gen del nanobody se encuentra flanqueado por sitios de restricción asimétricos reconocidos por la enzima Sfil, facilitando el clonado de otros nanobodies en este sitio. La construcción incluye además una cola de poli-histidina (6xHis) para facilitar la purificación por afinidad y el péptido señal OmpA para localización al periplasma, donde el ambiente oxidativo favorece la formación de enlaces disulfuro en los nanobodies.

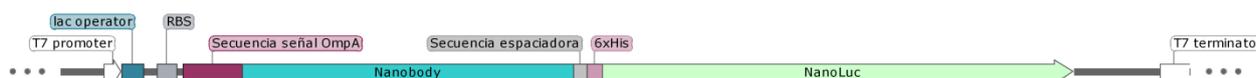


Figura 8 | Representación esquemática del cassette de expresión contenido en el vector pINQ-NanoLuc. El mismo incluye el promotor y terminador reconocidos por la ARN polimerasa de T7, el operador lac, un sitio de unión al ribosoma (RBS), el péptido señal OmpA de exportación al periplasma y una cola de poli-histidina (6xHis).

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la expresión, se realizaron cultivos de 5 mL en medio LB, variando la concentración de inductor y la temperatura de los cultivos luego de la inducción. Posteriormente, se evaluó la presencia de NbA2-NanoLuc tanto en la fracción soluble como insoluble de los extractos celulares mediante electroforesis SDS-PAGE (**figura 9**). Para todas las condiciones ensayadas, se observó gran cantidad de la proteína de interés en las fracciones insolubles de los extractos, indicando que la misma se encuentra formando cuerpos de inclusión. Sin embargo, la misma no pudo observarse en la fracción soluble. En las electroforesis SDS-PAGE correspondientes a la expresión a 20 y 28 °C se observa una baja cantidad de proteínas bacterianas en los extractos, indicando que la eficiencia de lisis no fue buena, lo cual dificulta la visualización de la proteína heteróloga si la misma se encuentra en baja cantidad. Por otra parte, para los extractos correspondientes a la expresión a 37 °C la lisis sí fue eficiente, pero de todas formas no se observa una banda dominante en la fracción soluble que pueda corresponder a la proteína heteróloga. Como alternativa para la detección de la quimera de interés en los extractos podría haberse recurrido a la realización de un Western blot o un ensayo ELISA, sin embargo, en este punto se decidió realizar una expresión a mayor escala utilizando un medio de cultivo más rico, y evaluar la producción de la quimera concentrándola a través de un proceso de purificación.

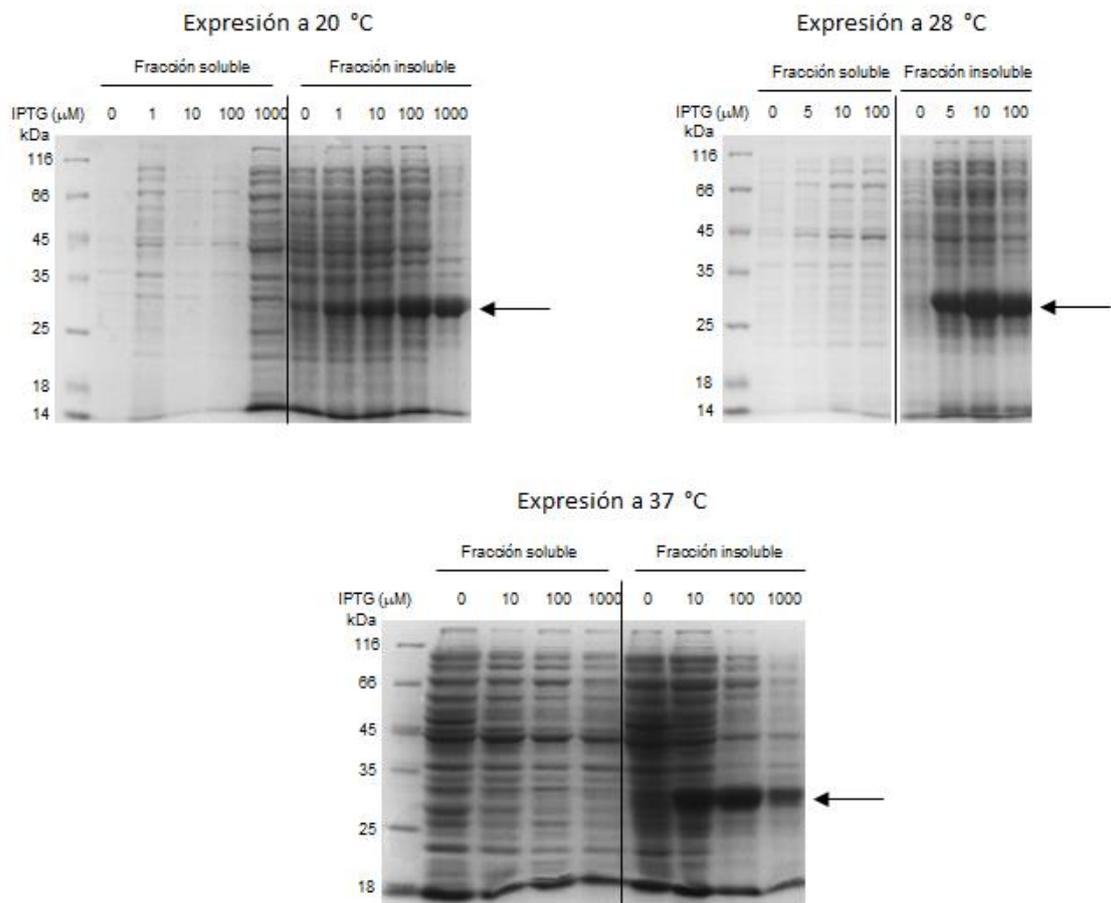


Figura 9 | Ensayos de expresión a pequeña escala de NbA2-NanoLuc. Electroforesis SDS-PAGE de extractos celulares de cultivos bacterianos, realizados a diferentes temperaturas de inducción y

concentraciones de inductor (IPTG). Se indica en cada caso con una flecha la altura de las bandas correspondientes a la proteína de interés.

Se realizó la expresión de NbA2-NanoLuc en cultivos de 200 mL utilizando tanto medio LB como el medio Terrific Broth (TB). Este último es un medio rico que permite alcanzar una mayor biomasa para un mismo volumen de cultivo, lo cual en ciertos casos podría compensar por el bajo nivel de expresión de la proteína. Se utilizaron además diferentes temperaturas de cultivo luego de la inducción, y cada una de las producciones fue purificada en forma independiente mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA.

Los cultivos fueron inducidos mediante el agregado de IPTG 100 μ M en cada uno de los medios, y fueron posteriormente incubados a 20, 28 o 37 °C (**figura 10**). En las producciones realizadas en medio LB, así como en la producción en medio TB inducida a 37 °C, la cantidad de proteína obtenida luego de la purificación fue muy baja y no fue posible cuantificarla. Por otra parte, la inducción en medio TB a 20 y 28 °C tuvo mejores rendimientos, obteniéndose luego de la purificación 3,3 y 2,0 mg de proteína por litro de cultivo respectivamente. La proteína fue alicuotada y almacenada a -20 °C. La fracción obtenida de la inducción a 20 °C fue la utilizada en los ensayos que siguen.

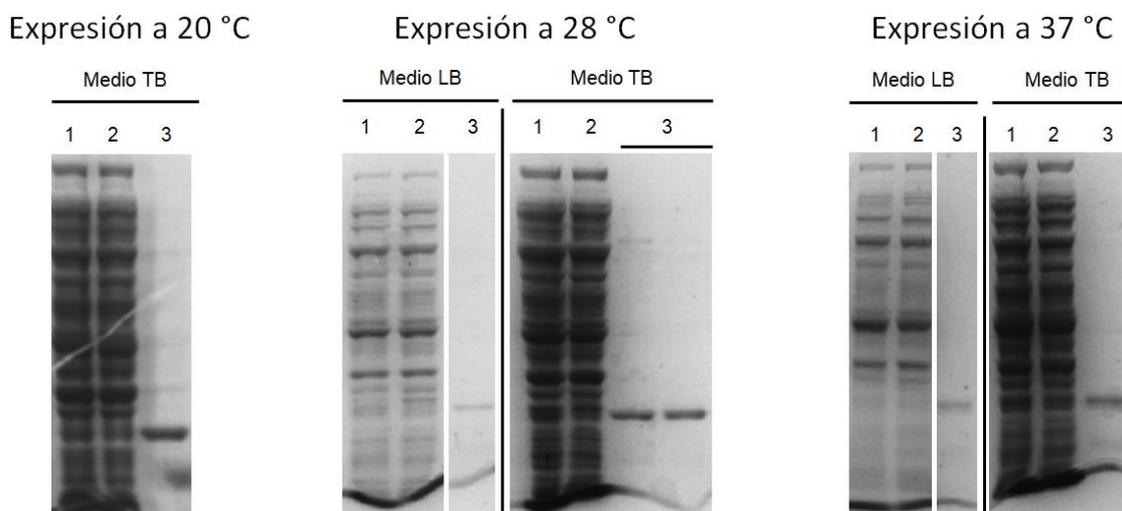


Figura 10 | Purificación de NbA2-NanoLuc a partir de cultivos realizados en distintos medios y con distintas temperaturas de inducción. La proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA. 1: extracto celular, 2: fracción no unida a la columna, 3: fracción eluida.

Se analizó la proteína purificada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, determinándose una masa de 34190,81 Da (**figura 11**), muy próxima al valor de 34181 Da predicho a partir de la secuencia aminoacídica, confirmándose que la proteína fue expresada en forma completa y el péptido señal OmpA fue clivado correctamente. No se observaron impurezas en la muestra en el rango de masas analizado.

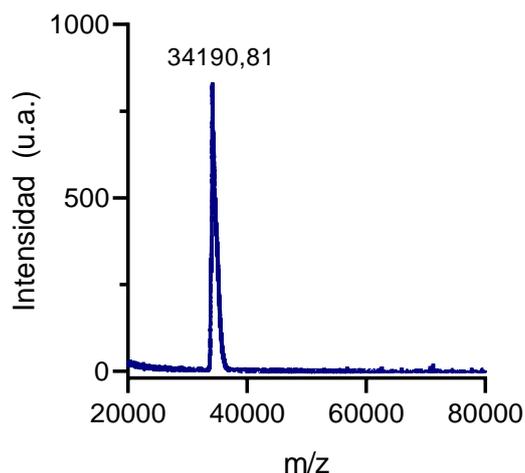


Figura 11 | Espectro de masas de NbA2-NanoLuc obtenido mediante MALDI-TOF.

1.2 Evaluación de la funcionalidad de la quimera producida

Dado el elevado costo de la solución pronta para usar de sustrato comercial, inicialmente se estudiaron distintos buffers para optimizar la preparación de una solución de sustrato propio utilizando furimazina. Finalmente, en función de la intensidad y estabilidad de la señal, se adoptó la solución buffer reportada por Ren *et al* con una concentración de 10 μM de furimazina[30], que fue utilizada a lo largo de esta tesis para los ensayos luminiscentes. Para evaluar la actividad de la enzima obtenida, se realizaron diluciones seriadas de la misma en una placa blanca de microtitulación. Tras el agregado del sustrato, la mezcla fue homogenizada durante 30 s antes de proceder a la medida de luminiscencia. Se observó actividad enzimática en un amplio rango de concentraciones (**figura 12**). Dado que el objetivo era llegar a implementar quimeras de este tipo como reactivos reporteros en ensayos ELISA, en los cuales las cantidades de proteína retenidas pueden ser muy bajas, es importante poder observar actividad enzimática con baja cantidad de enzima. Según los resultados mostrados en la **figura 12**, parece posible detectar cantidades de hasta 1 fg/pocillo; por debajo de este valor la señal es similar a la señal del blanco. En el punto de mayor cantidad de enzima evaluado (10 ng/pocillo) la señal alcanza aproximadamente el valor de saturación del equipo (10^6 URL).

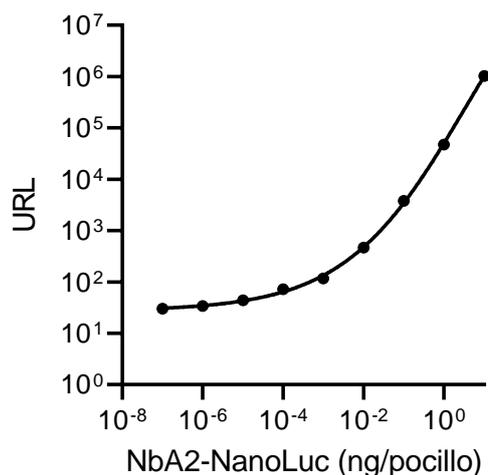


Figura 12 | Curva de titulación de la quimera NbA2-NanoLuc. Se realizaron diluciones seriadas de NbA2-NanoLuc en una placa blanca de microtitulación, y posteriormente se agregó el sustrato de la luciferasa.

Habiendo demostrado la actividad de la enzima, se planteó como pregunta si el tiempo transcurrido entre el agregado del sustrato y la realización de la medida era un factor crítico para el resultado. Al revelar un ensayo ELISA, lo usual es que el sustrato no sea dispensado en todos los pocillos a la vez. Sumado a esto, la lectura de luminiscencia requiere un tiempo de integración de la señal en cada pocillo, que en este caso fue fijada en 0,5 segundos, llevando el tiempo de lectura de una placa a aproximadamente 50 segundos. Esto podría llevar a variaciones entre los primeros y últimos pocillos medidos, especialmente en casos en que se procese un gran número de muestras. Por lo tanto, resultó importante evaluar si la señal luminiscente era suficientemente estable en el tiempo para que la variabilidad asociada a este aspecto no afectara las medidas. Para ello, se realizó un seguimiento de la señal luminiscente durante 120 minutos, determinándose que la misma poseía una vida media de 71,7 minutos (**figura 13**) en las condiciones ensayadas. A tiempos cortos, la señal disminuía en forma muy lenta: la señal bajó al 97,3% del valor inicial luego de 1 minuto (tiempo aproximado de lectura de una placa completa). Para los ensayos subsiguientes, se definió como protocolo comenzar la medida 30 s luego de finalizar el agregado de sustrato.

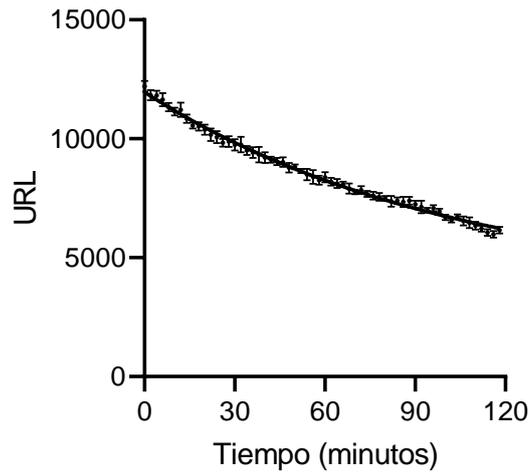


Figura 13 | Señal luminiscente generada por la enzima a lo largo de 120 minutos. Las medidas fueron realizadas con 0,1 ng de enzima por pocillo. Se grafica el promedio de sextuplicados y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Con el objetivo de evaluar también la reactividad del nanobody en la quimera, se realizó una titulación de NbA2-NanoLuc sobre pocillos sensibilizados con el conjugado BSA-microcistina. En paralelo, se tituló en formato colorimétrico el NbA2 producido anteriormente en el laboratorio (**figura 14**). Como se observa en la figura, el formato luminiscente da lugar a un mayor rango dinámico. Por otra parte, se observa que a concentraciones bajas de la quimera reportera (por ejemplo: 1 ng/mL) se obtiene un alto nivel de señal. Esto sería de gran importancia a la hora de implementar esta construcción en un ensayo ELISA de competencia, donde se espera que disminuir la concentración del anticuerpo utilizado favorezca la competencia, aumentando la sensibilidad del ensayo.

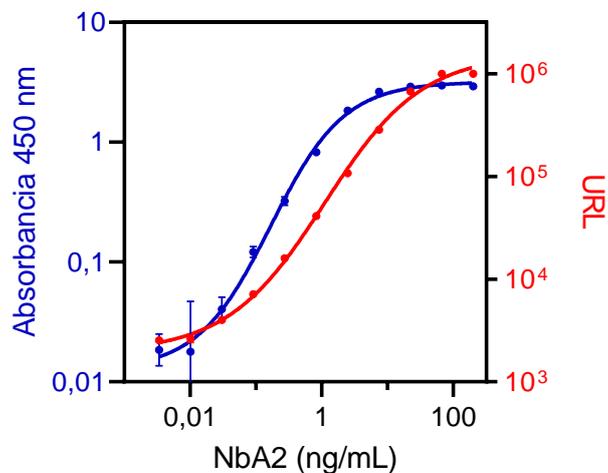


Figura 14 | Titulación del NbA2 en formato colorimétrico y luminiscente. Se incubaron diluciones seriadas de NbA2 biotinilado y NbA2-NanoLuc sobre pocillos de ELISA sensibilizados con BSA-

microcistina. El ensayo colorimétrico fue revelado con estreptavidina conjugada a peroxidasa. Se grafica el promedio de triplicados y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Como se mencionó anteriormente, otros miembros de nuestro grupo de trabajo llevaron a cabo la optimización de un ensayo ELISA de competencia para la detección de microcistina utilizando el nanobody A2, en formato colorimétrico[138]. Las condiciones determinadas para este ensayo fueron utilizadas para construir una curva de titulación de microcistina en formato luminiscente, utilizando NbA2-NanoLuc (**figura 15**). Tomando como límite de detección un 20% de inhibición fue posible detectar 0,54 ng/mL de la microcistina-LR. Como referencia, el límite máximo de microcistina en agua potable recomendado por la Organización Mundial de la Salud es de 1 ng/mL[139]. Si bien se trató de una primera exploración no optimizada del potencial del ensayo, se demostró la aplicabilidad de la quimera producida para la detección de esta toxina. Luego de esta prueba inicial, la versión luminiscente de este ensayo ha sido optimizada por otros integrantes de nuestro grupo, obteniéndose una sensibilidad superior al ensayo colorimétrico.

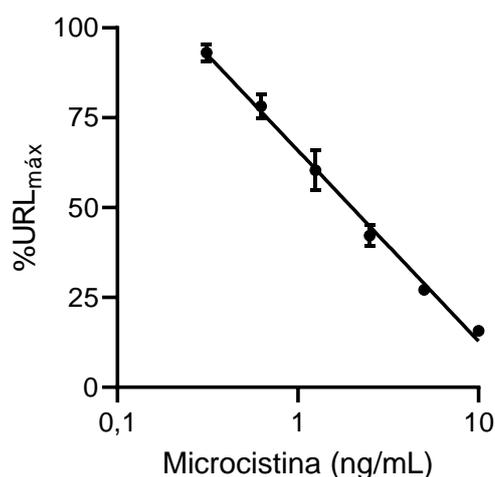


Figura 15 | Detección de microcistina mediante ELISA de competencia en formato luminiscente, utilizando NbA2-NanoLuc. Se grafica el promedio de triplicados y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Los resultados obtenidos hasta este punto para el uso de la enzima NanoLuc como reportera resultaron prometedores. A continuación, se pasó a desarrollar un ensayo que permitiera la aplicación de la misma al diagnóstico de SARS-CoV-2, abordando de esta forma un tema de gran importancia para toda la sociedad, especialmente al momento de comenzar este desarrollo.

Capítulo 2: Desarrollo de un inmunoensayo para la detección de proteína N de SARS-CoV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo

Este desarrollo fue parte de los esfuerzos realizados desde la academia para generar herramientas que pudiesen contribuir al manejo de la pandemia. Como se mencionó anteriormente, el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 mediante la detección de algún componente proteico del virus cumplió un papel fundamental en este sentido. El antígeno blanco de estos tests es por excelencia la proteína N, por dos motivos principales: es la proteína más abundante del virus en etapas iniciales de la infección, y por su localización en el interior de la partícula viral está sometida a una menor presión selectiva por parte del sistema inmune, lo cual disminuye la probabilidad de que los anticuerpos utilizados en su detección dejen de ser útiles al surgir nuevas variantes. Con el objetivo de desarrollar un inmunoensayo de captura en el cual eventualmente pudiera implementarse como reportera la luciferasa NanoLuc, se trabajó en primer lugar en la generación y selección de nanobodies específicos contra este antígeno.

Esta selección se realizó utilizando la técnica de Phage Display. Para ello, a partir de células mononucleares de sangre periférica de una llama inmunizada con el antígeno de interés se construyó una biblioteca de fagos filamentosos que presentan nanobodies en su superficie. Esta biblioteca constituye el punto de partida para la selección de nanobodies con la especificidad deseada. A continuación, mediante un proceso de panning se obtuvo una fracción de fagos enriquecida en clones específicos contra proteína N, y posteriormente mediante la realización de screenings se seleccionaron los clones más adecuados para su utilización en el inmunoensayo.

2.1 Selección de nanobodies anti-proteína N

2.1.1 Expresión recombinante de proteína N

Se produjeron dos versiones de la proteína N de SARS-CoV-2 en *E. coli*: la proteína N de longitud completa y una versión truncada, la cual carece de los primeros 121 aminoácidos (N Δ 121). Esta última es de interés porque estos 121 residuos representan la mayoría del dominio amino-terminal (NTD) e incluyen el motivo FYYLGTGP, altamente conservado en la proteína N de distintos coronavirus, por lo que podrían estar asociados a epítopes de reactividad cruzada[104, 105]. Mientras que la proteína N se expresó con el Twin-Strep-tag, la proteína N Δ 121 fue expresada en tándem con el péptido AviTag, que permite la biotinylación sitio-específica a través de la enzima biotina ligasa BirA. La biotinylación se realizó en dos etapas: una etapa *in vivo*, mediante la co-expresión de N Δ 121 y BirA, y otra etapa *in vitro* que consiste en la incubación a 37 °C del extracto celular que contiene ambas proteínas.

La proteína N fue purificada por afinidad en una columna StrepTrap XT (que presenta afinidad por el Twin-Strep-tag), mientras que N Δ 121 fue purificada en columna de Ni-NTA. Si bien los rendimientos luego de la purificación fueron buenos para ambas proteínas, la proteína N presentó un rendimiento superior a la versión truncada, de 34,6 mg por litro de cultivo en comparación con 3,8 mg para N Δ 121. La proteína N fue obtenida con muy buen nivel de pureza, observándose una única banda de aproximadamente 45 kDa, coherente con la masa molecular de 46,9 kDa calculada en base a la secuencia aminoacídica (**figura 16A**). Para el caso de la proteína N Δ 121, se observa una banda principal por encima de los 35 kDa, coherente con la masa molecular calculada de 35,9 kDa (**figura 16B**). Para esta proteína se observan además varias bandas adicionales de menor peso molecular. Es posible que algunas de ellas correspondan a contaminantes, sin embargo, la ausencia de bandas de masa molecular superior a la banda principal sugiere que se trata de productos de degradación. En particular, es probable que se trate de productos de autólisis, un fenómeno del que existen diversos reportes para la proteína N[140, 141] y en particular para N Δ 121[142, 143], y que se propone que podría cumplir una función en el ciclo viral[144, 145]. De todas formas, se continuó utilizando esta proteína dado que no se espera que la presencia de estos productos de degradación afecte su aplicación para la selección de nanobodies específicos.

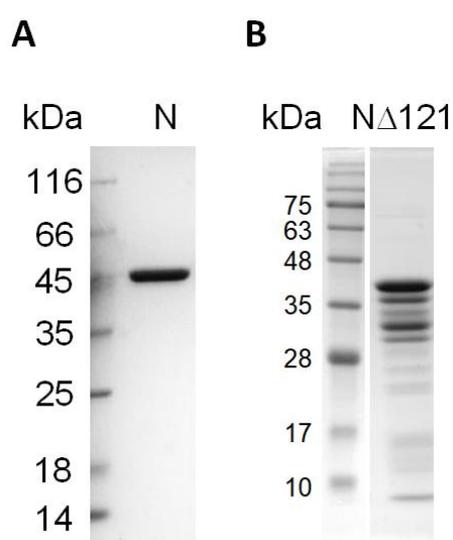


Figura 16 | Electroforesis SDS-PAGE de proteína N (A) y N Δ 121 (B) purificadas.

2.1.2 Inmunización de una llama y construcción de la biblioteca de Phage Display

Se administraron tres dosis de proteína N en adyuvante incompleto de Freund, con un período de 14-15 días entre cada dosis. La respuesta de anticuerpos fue monitoreada mediante ensayos ELISA analizando sueros extraídos periódicamente durante el proceso de inmunización (**figura 17**). Se observó un aumento progresivo del título de anticuerpos (definido como el factor de dilución del suero que da lugar al 50% de la señal máxima (*Saturation Concentration 50*, SC50)) con cada dosis. En la última extracción no se observó aumento de título, indicando

que se había alcanzado un máximo, por lo que se procedió a la construcción de una biblioteca de fagos filamentosos.

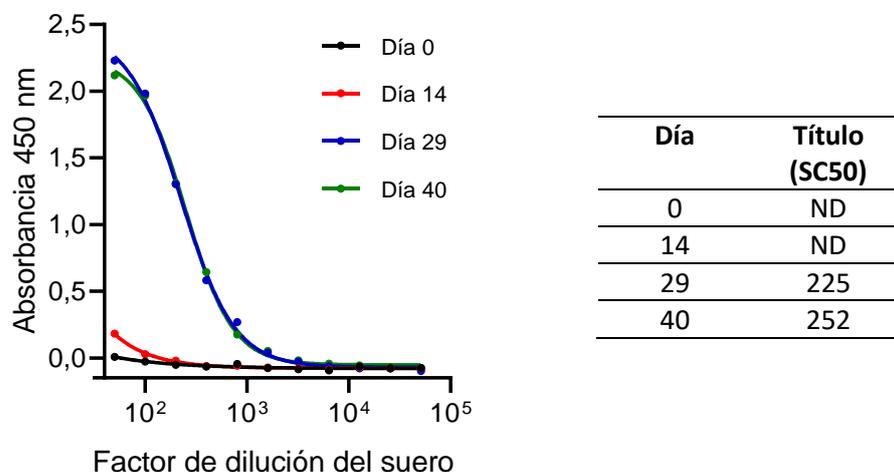


Figura 17 | Titulación de anticuerpos contra proteína N en sueros de la llama inmunizada. La titulación se realizó mediante ELISA, incubando los sueros sobre pocillos sensibilizados con proteína N y posteriormente revelando el ensayo utilizando un anticuerpo monoclonal anti-VHH conjugado a peroxidasa. El título fue definido como el factor de dilución del suero que da lugar al 50% de la señal máxima, de acuerdo al ajuste sigmoide de las curvas de titulación (*Saturation Concentration 50, SC50*). ND: No determinado.

La biblioteca de fagos fue construida a partir de 6×10^7 células mononucleares de sangre periférica, de las cuales se realizó una extracción de ARN seguida de retrotranscripción y PCR, para amplificar las secuencias codificantes de los dominios variables de los anticuerpos de cadena pesada. Estos genes fueron clonados en un vector fagémido y transformados en células *E. coli* ER2738, dando lugar a una biblioteca de 1×10^7 transformantes.

2.1.3 Selección de nanobodies contra la proteína N

Con el objetivo de desarrollar un ELISA en formato sándwich se seleccionaron clones específicos contra la proteína N a partir de la biblioteca generada. Para ello, se realizó en primer lugar un proceso de panning sobre pocillos de ELISA de alta adherencia sensibilizados con proteína N recombinante. Posteriormente, durante el proceso de screening, se trabajó con las dos versiones de la proteína N, la proteína de longitud completa y la versión truncada NΔ121. Como se mencionó, NΔ121 carece de la región amino-terminal que presenta regiones compartidas con otros coronavirus, y por tanto los nanobodies reactivos contra NΔ121 tienen menor probabilidad de presentar reactividad cruzada. Para evitar posibles falsos positivos en el diagnóstico, se buscó asegurar que al menos uno de los clones seleccionados para el ensayo fuera reactivo contra NΔ121, es decir, la región menos conservada de la proteína.

Alternativamente, podría haberse utilizado la proteína truncada para la inmunización y/o panning, asegurando de esta forma que la totalidad de clones obtenidos reconocieran esta región. Sin embargo, esta estrategia hubiera disminuido el repertorio de clones disponibles para realizar la selección, potencialmente excluyendo clones que, por ser de alta afinidad o por la posición relativa de su epítipo, podrían haber contribuido a maximizar la sensibilidad del ensayo.

Se realizaron tres rondas de panning. Para evaluar el conjunto de fagos obtenido luego de la tercera ronda (output 3), se seleccionaron 10 clones aleatoriamente y se determinó mediante ELISA su reactividad contra las proteínas N y N Δ 121 (**figura 18**).

Se observó que 7 de estos 10 clones presentaban reactividad contra al menos uno de los antígenos incluidos. En algunos casos la reactividad contra la proteína N Δ 121 fue mucho mayor que contra proteína N. Esto podría deberse a que N Δ 121 está biotinilada y fue inmovilizada a través de estreptavidina, posiblemente permitiendo preservar de mejor manera la integridad de sus epítopes en comparación con la proteína N, que es inmovilizada en forma directa sobre los pocillos.

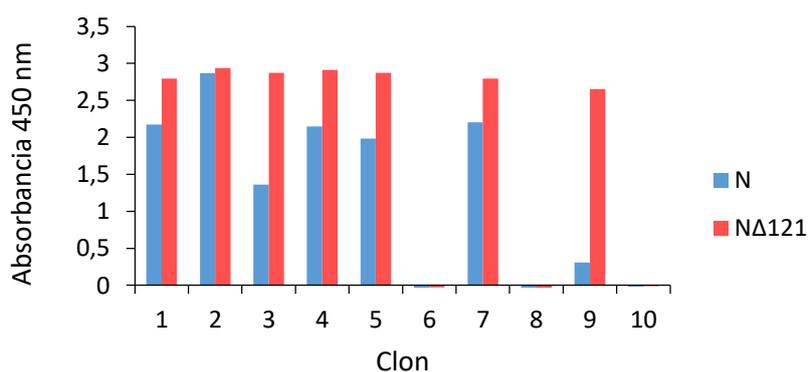


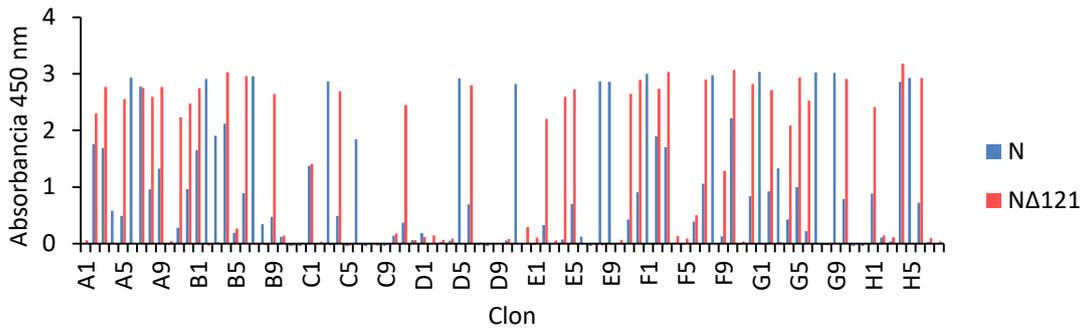
Figura 18 | Screening de 10 clones anti-proteína N. El screening se realizó incubando sobrenadantes de cultivo de cada uno de los clones en pocillos de ELISA sensibilizados con proteína N o estreptavidina seguida de N Δ 121 biotinilada, y revelando el ensayo con un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa.

Con el objetivo de evaluar un mayor número de clones de este output en forma más eficiente, el conjunto de genes de nanobodies obtenido del output 3 fue clonado en masa al vector de expresión pINQ-H6HA, que permite la expresión de nanobodies fusionados al tag 6xHis y el epítipo HA. Este vector fue utilizado para transformar células *E. coli* BL21(DE3) y, a partir de colonias aisladas, se realizaron cultivos de 92 clones en paralelo en un bloque de cultivo de 96 pocillos.

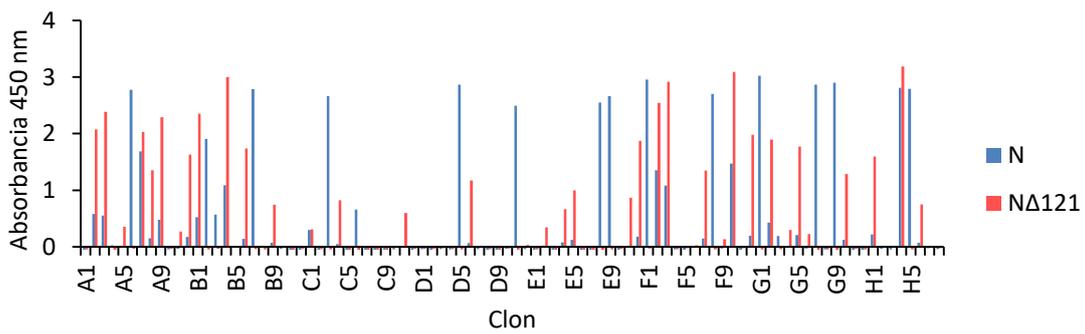
La reactividad de estos clones fue evaluada mediante ELISA, nuevamente contra ambas versiones de la proteína N (proteínas N y N Δ 121) (**figura 19**). Los extractos celulares fueron evaluados en diferentes diluciones, y los 10 clones que presentaron la mayor señal al ser analizados en una alta dilución, ya sea contra una u otra variante del antígeno, fueron

seleccionados para continuar su caracterización. Dado que el nivel de expresión entre diferentes clones de nanobodies puede variar significativamente, los clones seleccionados por generar una alta señal podrían ser clones de alta afinidad y/o alto nivel de expresión.

A



B



C

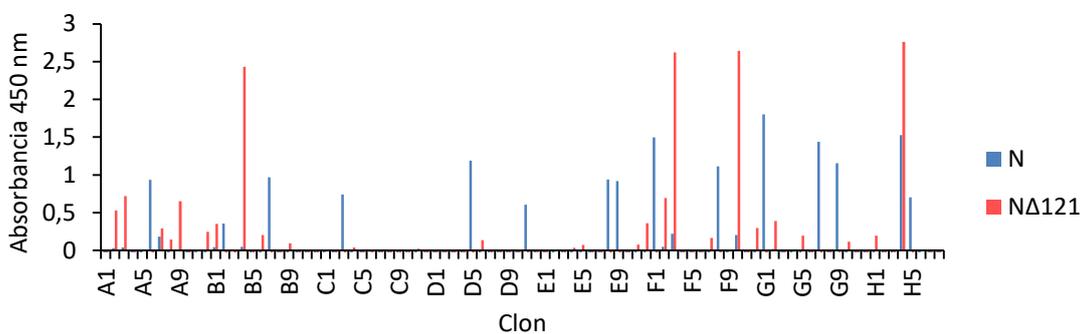


Figura 19 | Screening de 92 clones anti-proteína N. La reactividad se determinó incubando los extractos celulares de cultivos bacterianos en dilución 10^{-1} (A), 10^{-2} (B) o 10^{-3} (C) sobre pocillos de ELISA sensibilizados con proteína N o estreptavidina seguida de $N\Delta 121$ biotinilada, y revelando el ensayo con un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa.

Uno de los factores determinantes para la obtención de inmunoensayos de alta sensibilidad es contar con anticuerpos de alta afinidad. En particular en el caso de ensayos ELISA, donde se realizan incubaciones que permiten alcanzar el equilibrio en la unión antígeno-anticuerpo, es crucial que los anticuerpos presenten una baja constante cinética de disociación (k_{off}), minimizando la probabilidad de disociación del complejo una vez que se ha formado. Teniendo esto en cuenta, se decidió realizar a partir del output 2 obtenido otra tercera ronda de panning en paralelo, utilizando una estrategia orientada a la obtención de clones de baja k_{off} . En esta instancia, luego de incubar la biblioteca sobre los pocillos sensibilizados con proteína N, se implementó una etapa de competencia *overnight* donde los fagos unidos en la placa fueron incubados con una solución de antígeno en amplio exceso con respecto al antígeno inmovilizado. De esta forma, los clones con mayor constante cinética de disociación (k_{off}), que eventualmente puedan disociarse durante la incubación, serán capturados por el antígeno en solución y eliminados durante los lavados posteriores. Finalmente, los clones de menor k_{off} que permanezcan unidos al antígeno en la placa serán eluidos.

En forma similar a lo descrito anteriormente, para evaluar el conjunto de fagos obtenido utilizando esta estrategia (denominado output 3-ON), se determinó mediante ELISA la reactividad de 10 clones contra la proteína N y NΔ121 (**figura 20**). Cuatro de estos clones resultaron fuertemente positivos, lo cual es una proporción menor a la obtenida al aplicar la estrategia convencional, donde se obtuvo un 70% de clones positivos. Dada esta baja proporción, se decidió no proceder a un screening de mayor escala a partir de este output. De todas formas, los 4 clones positivos fueron sumados a los 10 previamente seleccionados para continuar su caracterización.

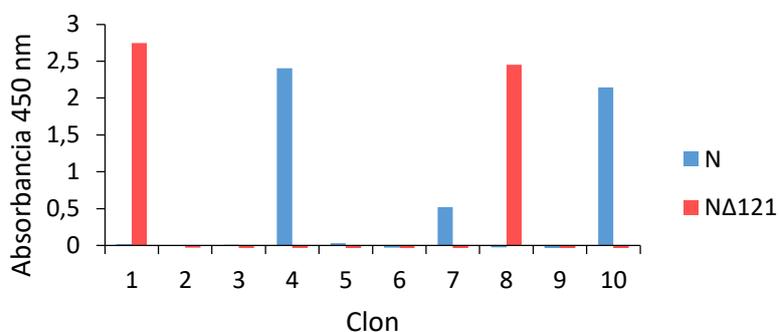


Figura 20 | Screening de 10 clones anti-proteína N obtenidos mediante la estrategia de panning orientada a la obtención de clones de baja k_{off} (output 3-ON). El screening se realizó incubando sobrenadantes de cultivo de cada uno de los clones en pocillos de ELISA sensibilizados con proteína N o estreptavidina seguida de NΔ121 biotinilada, y revelando el ensayo con un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa.

Los 14 clones seleccionados de ambos outputs fueron secuenciados. Una de las secuencias obtenidas del output 3-ON fue descartada por corresponder a un clon doble. Dentro de las 13 secuencias restantes, se identificaron 6 secuencias únicas (**figura 21A**). Dos de las secuencias

obtenidas en el output 3-ON (ON8 y ON10) no habían sido identificadas mediante el panning convencional (**figura 21B**). Todas ellas corresponden a dominios VHH, presentando en la región framework 2 (FR2) los residuos característicos (F/Y42, E/Q49, R50 y F/G/L52), los cuales difieren de los encontrados en estas posiciones en los dominios VH[80].

A

Nb	FR1	CDR1	FR2	CDR2
D5	EVQLVESGGGLVQPGEISRLSCAAP	GFTLDYYT	IGWFRQAPGKERECVS	CISGGRGSI
ON10	Q.....Q.....G.....S	.LR.G... .A.....I. . .RSD..T		
ON8A.A.G.....S	.LIFSDNS	M..Y.....Q..DL.A	S..-NDDNT
F3A.G.....S	..PFSFNA	MA.....NQ..L.A	A.A-TTNAT
H4A.G.....S	..PFRFNA	MA.....NQ..L.A	G.F-TTYAT
B4G.G.....E.S	..PFRFNA	MA.....NQ..L.A	G.D-TTDAT

Nb	FR3	CDR3	FR4
D5	YYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKSEDTAVYYC	ATARRVSFSSCFPASS-EYDF	WGQGTQVTVSS
ON10T...E.....P.....	..-DF.PA.H.AV.NTRG..Y
ON8	N.G.....F.....P.....	NLKT.P.-----WTQTTD.Y
F3	N..E.....L..G..P.....	NV.YYSAG-----IPRPL..D
H4	N..E.....D.....P...G....	NA.YVSTS-----IWRPL..D
B4	N.SE.....P.....	NV.YISTR-----IWRPL..N

B

Nb	Número de secuencias	
	Output 3 (total: 10 secuencias)	Output 3-ON (total: 3 secuencias)
D5	6	1
ON10	0	1
ON8	0	1
F3	2	0
H4	1	0
B4	1	0

Figura 21 | Secuenciación de clones anti-proteína N. (A) Alineamiento de las seis secuencias aminoacídicas únicas obtenidas. Se denota con un punto (.) a los aminoácidos conservados en referencia al clon D5, y con un guión (-) la ausencia de aminoácidos. Los aminoácidos característicos de los dominios VHH se destacan en celeste. **(B)** Cantidad de veces que fue observado cada clon dentro de cada uno de los outputs.

Para continuar con la caracterización de los nanobodies obtenidos, la expresión de estas seis proteínas fue inducida en cultivos de 2 mL de *E. coli* BL21(DE3), a partir de los cuales se obtuvieron extractos celulares para su análisis mediante ELISA (**figura 22**). La titulación de los extractos celulares permitió observar diferencias en la reactividad de los clones, que responden a diferencias tanto en su afinidad como en su nivel de expresión. En esta instancia, se utilizó este criterio para seleccionar un número menor de clones para su expresión a mayor escala y purificación, seleccionándose los clones D5, H4 y ON10.

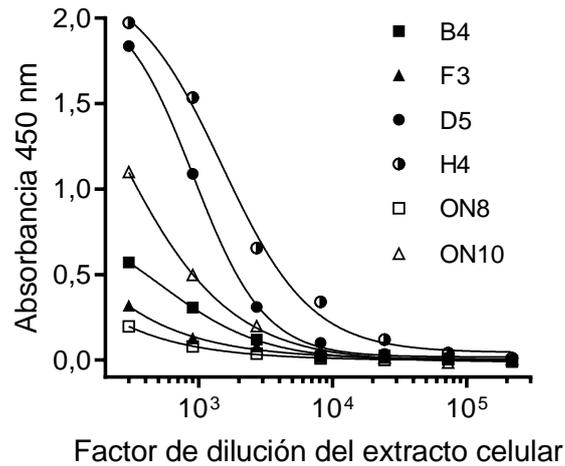
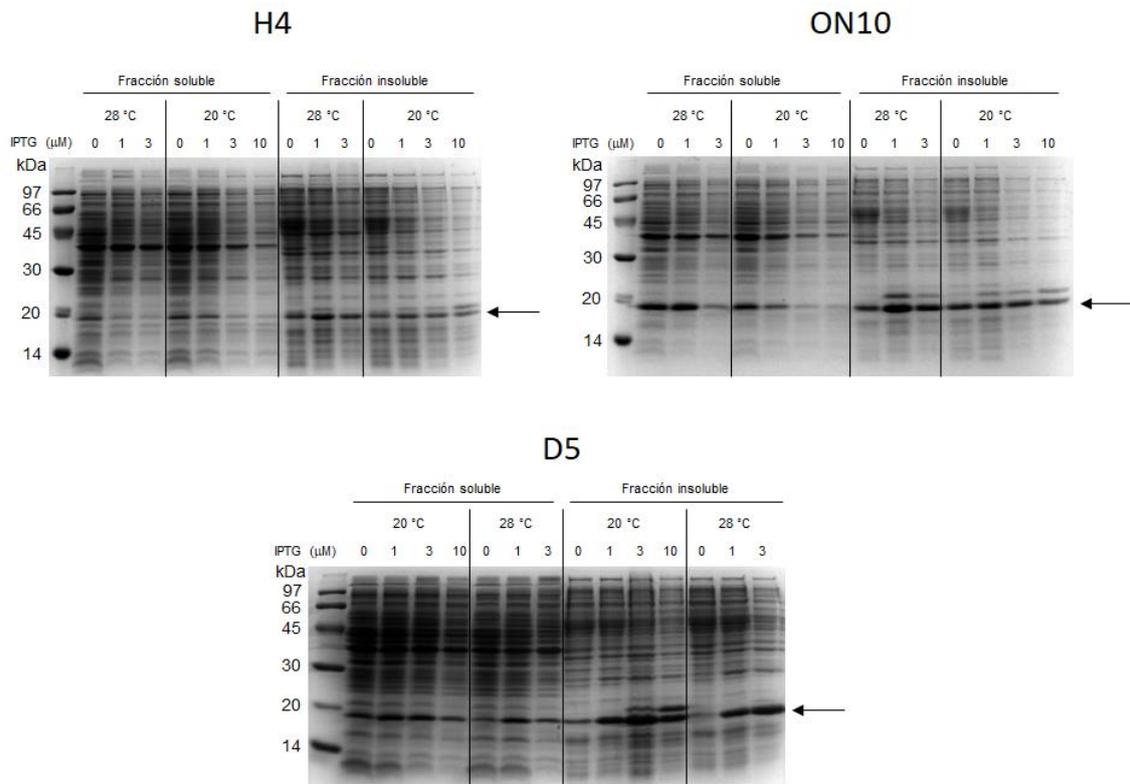


Figura 22 | Titulación de extractos de cultivos celulares de seis clones diferentes sobre pocillos de ELISA sensibilizados con proteína N. Los clones en que se observa mayor reactividad son aquellos con mayor afinidad y/o nivel de expresión.

Para poder evaluar el potencial de estos clones para formar pares de captura/detección en un ensayo ELISA sándwich, los mismos debieron ser producidos en dos versiones con diferentes tags, de forma de poder ser detectados en forma independiente. Para esto se utilizaron los vectores pINQ-H6HA y pINQ-BtH6, que permiten respectivamente la expresión en tándem al epítipo HA o al péptido AviTag, este último para la biotilación sitio-específica. Para cada clon, se optimizaron las condiciones de expresión realizando pruebas a pequeña escala con distintas concentraciones de inductor y temperaturas (**figura 23A**). Utilizando las condiciones de óptima expresión (IPTG 1 μ M a 20 °C para H4 y ON10 e IPTG 1 μ M a 28 °C para D5) se realizó la expresión de los clones a mayor escala y purificación por afinidad en columnas de Ni-NTA (**figura 23B**). Los rendimientos luego de la purificación fueron de entre 4,0 y 18,5 mg por litro de cultivo celular.

A



B

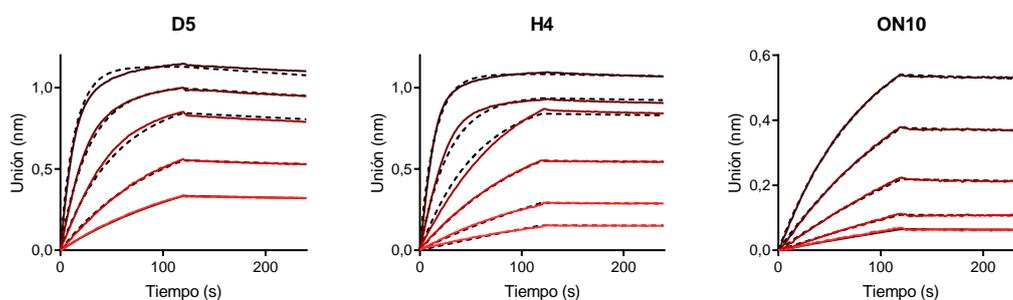


Figura 23 | Producción de nanobodies anti-proteína N. (A) Electroforesis SDS-PAGE de extractos celulares de cultivos bacterianos de los diferentes clones, expresados utilizando el vector pINQ-H6HA. Los cultivos fueron realizados bajo diferentes condiciones de inducción, variando la temperatura y la concentración de inductor (IPTG). El tiempo de cultivo luego de la inducción fue de 16-18 horas. Se indica en cada caso con una flecha la altura de las bandas correspondientes a nanobodies. **(B)** Electroforesis SDS-PAGE de los nanobodies purificados. -Bt y -HA representan respectivamente nanobodies biotinilados en forma sitio-específica o expresados en tándem con el epítipo HA.

2.1.4 Caracterización de los tres nanobodies seleccionados mediante interferometría de biocapa

La interferometría de biocapa es una técnica que permite monitorear en tiempo real la unión de una proteína que inicialmente se encuentra en solución sobre otra que se encuentra inmovilizada sobre un biosensor, así como posteriormente monitorear su disociación. De esta forma, permite determinar constantes cinéticas de formación (k_{on}) y disociación de complejo (k_{off}), y a partir de éstas calcular constantes de equilibrio de disociación (K_D). En primer lugar, la técnica fue empleada para medir la afinidad de los clones seleccionados mediante la determinación de sus constantes de equilibrio de disociación (**figura 24**). Todos los clones presentaron una alta afinidad de unión a su antígeno, destacándose H4 con una K_D de $5,83 \times 10^{-10}$ M, frente a las constantes de D5 de $2,21 \times 10^{-9}$ M y ON10 de $7,82 \times 10^{-9}$ M.

A



B

Clon	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
D5	$2,21 \times 10^{-9}$	$1,81 \times 10^5$	$3,99 \times 10^{-4}$
H4	$5,83 \times 10^{-10}$	$1,75 \times 10^5$	$1,02 \times 10^{-4}$
ON10	$7,82 \times 10^{-9}$	$2,78 \times 10^4$	$2,17 \times 10^{-4}$

Figura 24 | Medidas de afinidad de los nanobodies anti-proteína N seleccionados. (A) Sensogramas de interferometría de biocapa obtenidos para la determinación de las constantes cinéticas de asociación y disociación. La asociación y disociación de cada nanobody fue medida a concentraciones de nanobody de 400, 200, 100, 50, 25 y 10 nM (esta última sólo fue posible para el clon H4) sobre sensores amino-reactivos donde la proteína N fue inmovilizada covalentemente. Los datos fueron ajustados globalmente a un modelo de unión 1:1 (línea punteada). **(B)** Constantes de equilibrio de disociación y constantes cinéticas de asociación y disociación determinadas.

Curiosamente ON10, que fue seleccionado utilizando la estrategia de panning orientada a la obtención de clones de baja k_{off} , presentó la peor afinidad por la proteína N (mayor valor de K_D) como consecuencia de una lenta k_{on} . *A priori*, podría considerarse que esto se traduciría en un peor desempeño para el desarrollo del ensayo. Sin embargo, y como se ha mencionado

previamente, en el formato de ELISA en el cual se alcanza el equilibrio en la unión antígeno-anticuerpo, el factor determinante es una lenta k_{off} , la cual para ON10 es similar a la de los clones obtenidos mediante la estrategia de panning convencional. Adicionalmente, cabe destacar que este clon no formaba parte de los recuperados mediante la estrategia convencional de panning, y por lo tanto el uso de una estrategia alternativa en este caso permitió ampliar el repertorio de clones a partir del cual realizar la selección. Esto puede cobrar gran relevancia en el desarrollo de ensayos que requieren la unión simultánea de un par de anticuerpos, donde la selección de pares que maximicen la sensibilidad del ensayo depende en gran medida no solo de su afinidad, sino de la posición relativa de sus epítopes.

En este sentido, se realizó un binning de epítopes para determinar si estos clones presentaban epítopes solapantes. Para ello, se incubó al antígeno inmovilizado sobre biosensores con concentraciones saturantes de cada uno de los nanobodies en forma secuencial. Se observó la unión secuencial de todos los nanobodies independientemente del orden en el cual se incubaran (**figura 25**), demostrando que sus epítopes no son solapantes y que la unión de uno de estos clones en ningún caso implica un impedimento estérico para la unión de los demás. La posibilidad de unión simultánea de estos nanobodies a su antígeno constituye una precondición que deben cumplir para constituir pares de captura/detección en un ELISA sándwich.

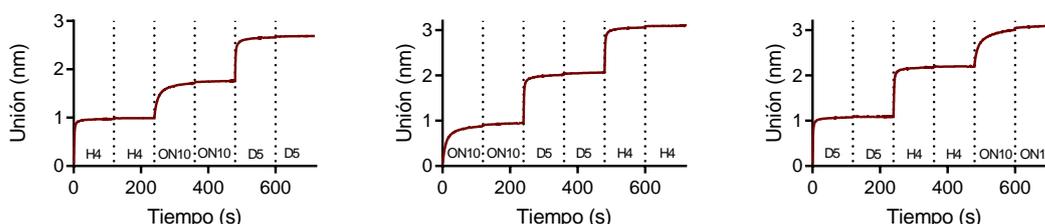


Figura 25 | Sensogramas correspondientes al binning de epítopes realizado sobre proteína N inmovilizada covalentemente en biosensores amino-reactivos. Cada nanobody fue incubado dos veces consecutivamente para asegurar la saturación de los sitios de unión. Se analizaron órdenes de unión alternativos de los diferentes nanobodies para confirmar que era posible la unión simultánea de todos ellos.

2.2 Desarrollo de un ELISA colorimétrico para la detección de proteína N

2.2.1 Optimización de las condiciones del ensayo

A partir de los nanobodies seleccionados, se buscó montar un ensayo en formato ELISA sándwich para la detección de proteína N. Para la etapa de captura, se decidió inmovilizar nanobodies biotinilados sobre pocillos sensibilizados con estreptavidina. Esta elección se debe a que, como se ha reportado previamente tanto por nuestro grupo[146] como por otros[147, 148], al sensibilizar directamente pocillos de ELISA con nanobodies la captura del antígeno suele ser ineficiente. Dado que los nanobodies son de pequeño tamaño, es probable que su estructura, y por tanto su capacidad de unión a antígeno, se vea comprometida al adsorberse a

la placa. Adicionalmente, la inmovilización a través de estreptavidina contribuye a una orientación espacial más favorable para la captura, dado que la biotinylation sitio-específica se realiza sobre el extremo C-terminal del nanobody, ubicado espacialmente en la cara “opuesta” al parátipe. Luego de la etapa de captura del antígeno, el mismo se detecta utilizando un nanobody con tag HA seguido por un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (**figura 26**).

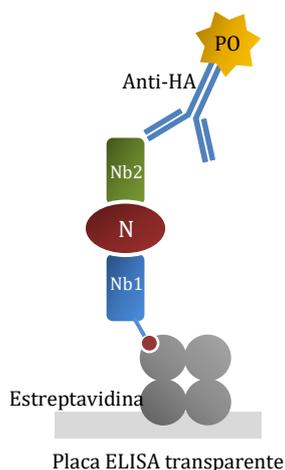


Figura 26 | Representación esquemática del ensayo ELISA de captura en formato colorimétrico. Los nanobodies biotinilados son inmovilizados en forma orientada sobre pocillos sensibilizados con estreptavidina, y la proteína N capturada es detectada con nanobodies fusionados al epítipo HA seguidos por un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa (PO).

Para determinar el mejor par de captura/detección, se evaluaron todas las combinaciones posibles de los nanobodies H4, D5 y ON10 (**figura 27A**) para la detección de 5 ng/mL de proteína N recombinante. Ninguno de los pares presentó señal de background en ausencia de proteína N. Cabe señalar que ningún clon apareado con sí mismo es capaz de detectar el antígeno, a pesar de que este último es multimérico, probablemente porque todos los epítopes son bloqueados por el nanobody inmovilizado en la placa. El par H4/ON10 generó la mayor señal en este ensayo, y por lo tanto fue seleccionado para continuar con el desarrollo del mismo. El clon de captura, H4, es el de mayor afinidad, lo cual podría ser uno de los motivos por los cuales permite maximizar la sensibilidad en la detección del antígeno. Además, este clon presenta reactividad contra NΔ121, indicando que su epítipo se encuentra en la región menos conservada de la proteína, por lo cual puede esperarse que contribuya a que el ensayo presente una alta especificidad.

Habiendo seleccionado el par de nanobodies de captura/detección, se exploró el uso de distintas soluciones bloqueantes en el ensayo (**figura 27B**). Si bien no se observaron grandes diferencias entre los bloqueantes, se seleccionó a la solución de caseína para seguir trabajando por presentar la menor señal de blanco.

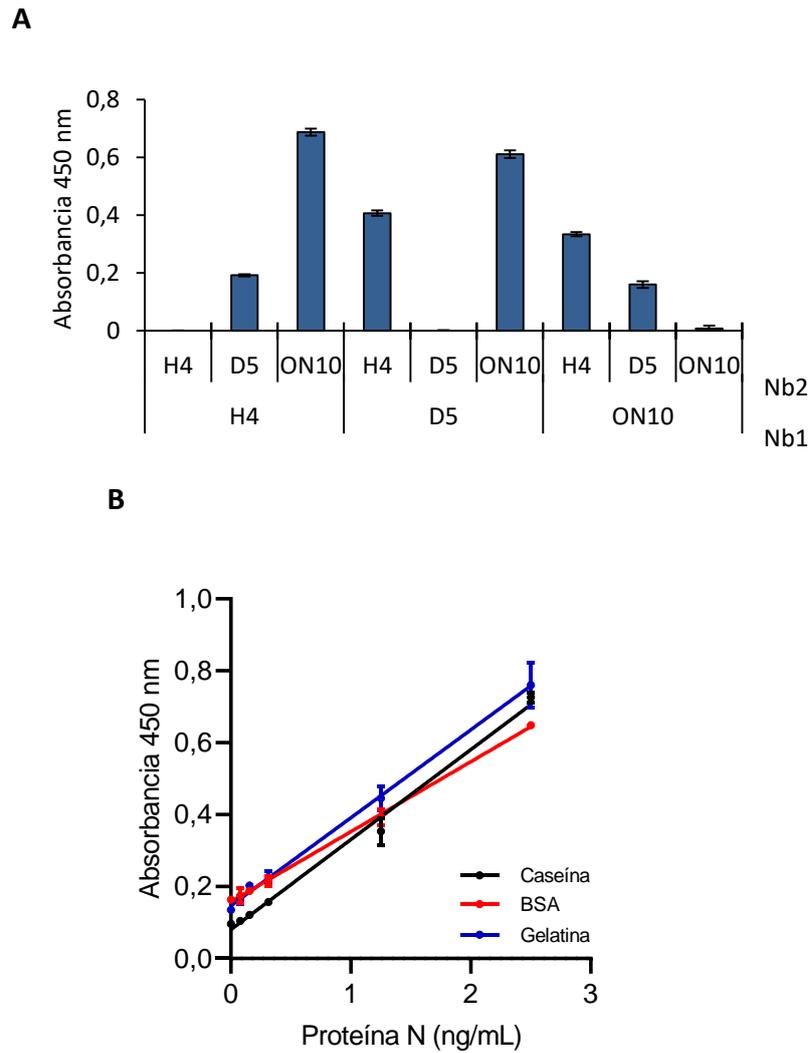


Figura 27 | Optimización de aspectos del ensayo colorimétrico para la detección de proteína N. (A) Determinación del mejor par de nanobodies de captura/detección. Se evaluaron las nueve combinaciones posibles utilizando los tres nanobodies seleccionados para la detección de 5 ng/mL de proteína N. **(B)** Evaluación del uso de diferentes soluciones bloqueantes.

Para determinar la sensibilidad analítica del ensayo, se realizó una curva de titulación de la proteína N recombinante (**figura 28**). El límite de detección, 121 pg/mL, fue calculado como el valor promedio de absorbancia del blanco (absorbancia en ausencia de antígeno) más tres veces el valor de la desviación estándar.

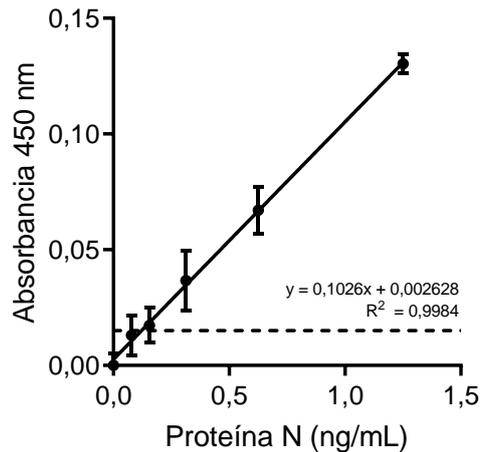


Figura 28 | Curva de titulación de antígeno con el par de captura/detección seleccionado (H4/ON10). Se analizaron diluciones seriadas de proteína N; se grafica el promedio de triplicados y las barras de error corresponden a la desviación estándar. La línea punteada representa el límite de detección, calculado como el valor promedio de absorbancia del blanco más 3 veces la desviación estándar.

2.2.2 Detección de proteína N en muestras de hisopado nasofaríngeo

A continuación, se evaluó la capacidad del ensayo de detectar el antígeno en muestras clínicas. Para ello, se contó con alícuotas de descarte sin identificar de muestras de hisopado nasofaríngeo que habían sido previamente analizadas por RT-qPCR, proporcionadas por la empresa ATGen en su medio de transporte viral (VTM). Dado que las muestras podrían contener virus viable, por motivos de seguridad se procuró la inactivación del mismo mediante el agregado de Tritón X-100 0,5%, acorde a lo reportado por Welch *et al*[136]. Mediante la realización de curvas de titulación de proteína N en presencia de este detergente, se verificó que el mismo no afecta la captura del antígeno (**figura 29A**).

Un aspecto importante a considerar fue la posibilidad de que la matriz de las muestras interfiriera en la detección, enmascarando posibles resultados positivos. Si este fuera el caso se esperaría que la dilución de la muestra llevara a un aumento de la señal observada. Para evaluar esto se contó inicialmente con n=7 muestras, que fueron analizadas en diferentes diluciones en VTM (**figura 29B**). En ningún caso se observó un aumento en la señal al aumentar la dilución, por lo que parece improbable la presencia de un efecto matriz. Por consiguiente, desde este punto todas las muestras fueron analizadas sin diluir.

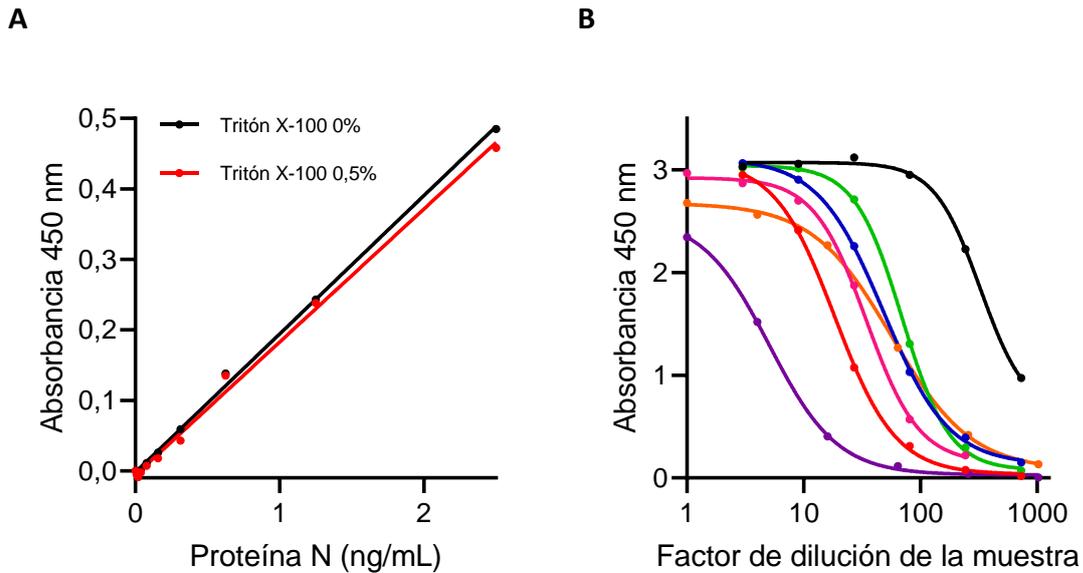


Figura 29 | Evaluación de aspectos vinculados al análisis de muestras de hisopado nasofaríngeo. (A) Efecto del agregado de tritón 0,5% en medio VTM sobre la detección de proteína N. Para ello, se realizaron curvas de titulación del antígeno en presencia o ausencia de este aditivo. **(B)** Evaluación del efecto de la dilución de 7 muestras de hisopado nasofaríngeo en VTM.

Habiendo establecido estos aspectos, se realizó un análisis de 19 muestras positivas y 10 negativas por RT-qPCR, y los resultados fueron analizados mediante la construcción de una curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) (**figura 30**). Este tipo de análisis permite visualizar cómo se ven afectados los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica al variar el valor de corte entre muestras positivas y negativas. Se seleccionó un valor de corte tal que la especificidad del ensayo fuera del 100% (intervalo de confianza (IC) 95%: 69,2%-100,0%), determinando de esta forma una sensibilidad de 68,4% (IC 95%: 43,5%-87,4%). El ensayo permitió identificar como positivas 13 de las 19 muestras.

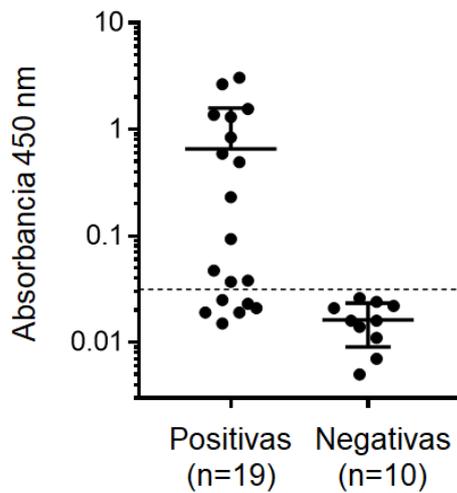
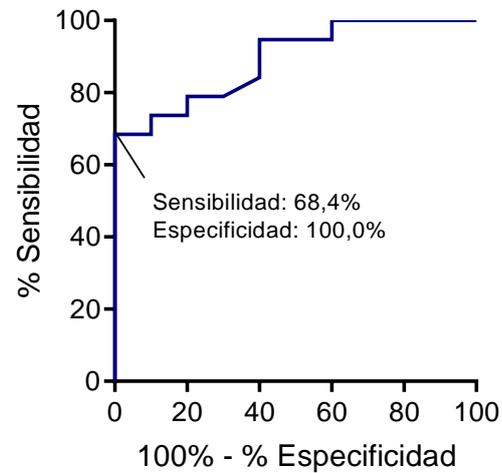
A**B**

Figura 30 | Detección de proteína N mediante ELISA colorimétrico en muestras de hisopado nasofaríngeo previamente clasificadas como positivas (n=19) o negativas (n=10) mediante RT-qPCR. (A) Diagrama de puntos. El valor de corte mostrado (línea punteada) fue determinado a través del análisis de curva ROC. (B) Análisis de los mismos datos a través de una curva ROC.

2.3 Adaptación del ensayo a un formato luminiscente mediante el uso de una quimera nanobody-NanoLuc

Habiendo seleccionado un par de nanobodies y optimizado un ensayo colorimétrico para la detección de proteína N, se procedió a la adaptación de este ensayo a un formato luminiscente, mediante la producción de una quimera Nb-NanoLuc que sustituya al Nb-HA y el anticuerpo anti-HA en el revelado del ensayo (**figura 31**). Este ensayo luminiscente presentaría diversas ventajas: por un lado se esperaba que permitiera una mejora en la sensibilidad diagnóstica, y por otro, permite prescindir de un anticuerpo secundario comercial, dando lugar a un ensayo donde todos los reactivos pueden ser producidos en forma recombinante. Se trata además de un ensayo más rápido, ya que requiere una etapa menos de incubación.

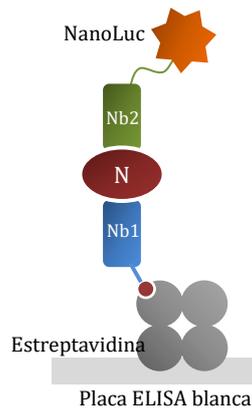


Figura 31 | Representación esquemática del ensayo ELISA de captura en formato luminiscente. El nanobody de captura biotinilado es inmovilizado en forma orientada sobre pocillos sensibilizados con estreptavidina, y la proteína N capturada es detectada mediante un nanobody fusionado a la luciferasa NanoLuc.

2.3.1 Expresión recombinante de la quimera NbON10-NanoLuc

Para la expresión de esta quimera en *E. coli*, el gen del nanobody ON10 fue clonado en el vector pINQ-NanoLuc. Con el fin de maximizar el nivel de expresión de proteína recombinante, se realizó una optimización de codones de la secuencia génica de este nanobody mediante dos plataformas, Genewiz (de Azenta Life Sciences, disponible en genewiz.com) e IDT Codon Optimization Tool (de Integrated DNA Technologies, disponible en idtdna.com). La optimización de codones mediante este tipo de plataformas es una estrategia que permite modificar la composición de codones en un gen para su expresión recombinante, con el fin de mejorar su nivel de expresión en forma soluble (es decir, evitando la formación de cuerpos de inclusión). Existen diversos algoritmos para esto, que en su mayoría buscan ajustar la proporción de uso de los codones sinónimos a la distribución natural del hospedero de expresión, en este caso *E. coli*. Tanto la secuencia original de ON10 como las dos versiones optimizadas generadas fueron clonadas en el vector, y se exploraron diferentes condiciones para su expresión, variando el medio de cultivo utilizado, la temperatura de inducción y la concentración de inductor utilizada (**figura 32**). Bajo ninguna de estas condiciones se pudo observar en la fracción soluble una banda distinta a las observadas en el extracto sin inducir. Considerando los resultados obtenidos anteriormente al realizar ensayos de expresión de NbA2-NanoLuc, donde a pesar de no observarse expresión a pequeña escala se pudo obtener proteína al realizar producciones a mayor escala, se realizó una producción a mayor escala de NbON10-NanoLuc en medio TB. Desafortunadamente, en esta oportunidad no se logró obtener proteína luego de la purificación. En conjunto, estos resultados indican que la obtención de estas quimeras en la fracción soluble del extracto celular depende de la secuencia del nanobody. A pesar de esto, como se verá más adelante en esta tesis, la experiencia posterior con numerosas quimeras Nb-NanoLuc mostró que este caso es minoritario y más bien excepcional.

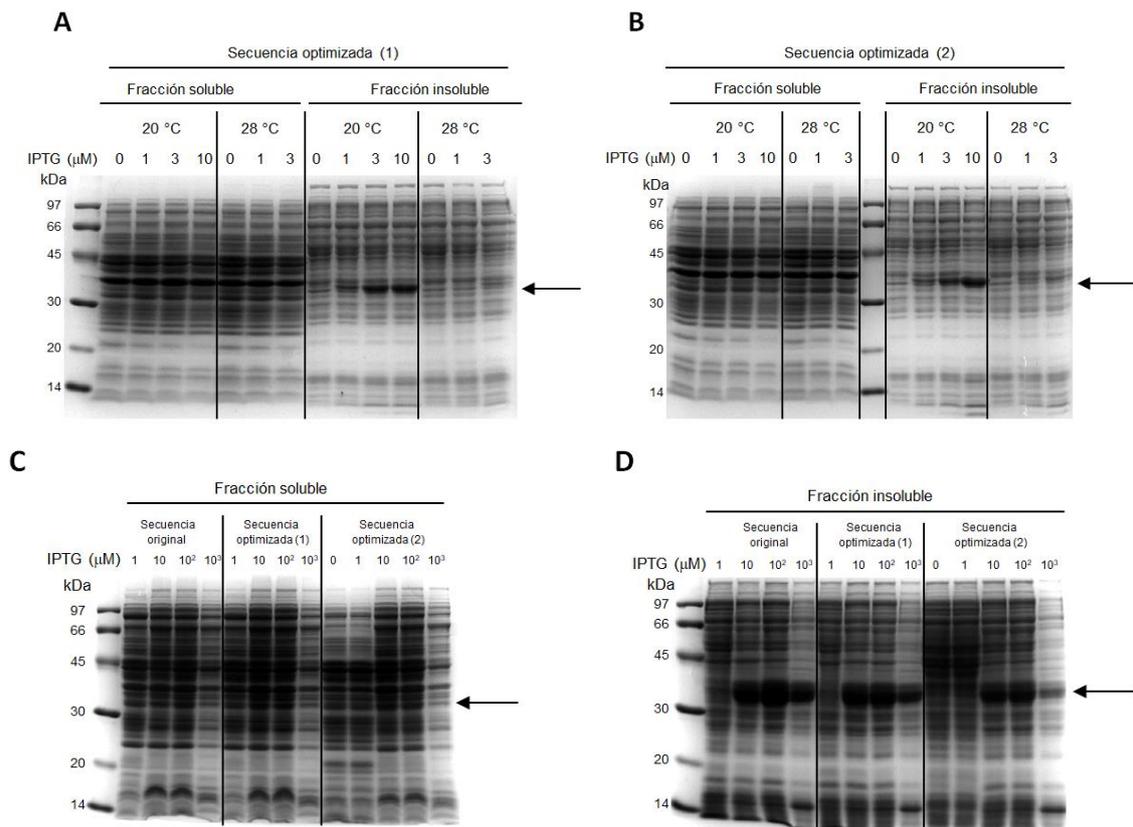


Figura 32 | Electroforesis SDS-PAGE de extractos celulares de cultivos bacterianos para evaluar el nivel de expresión de NbON10-NanoLuc. Se realizó la expresión a partir de diferentes secuencias nucleotídicas (con codones optimizados o no), en diferentes medios de cultivo y bajo diferentes condiciones de inducción. El tiempo de cultivo luego de la inducción fue de 16-18 horas. Se indica en cada caso con una flecha la altura de las bandas correspondientes a NbON10-NanoLuc. **(A)** y **(B)** corresponden a expresión en medio LB, **(C)** y **(D)** corresponden a expresión en medio TB a 20 °C. La secuencia optimizada (1) se obtuvo mediante el algoritmo de IDT, mientras que la secuencia optimizada (2) se obtuvo utilizando el algoritmo de Genewiz.

Por otra parte, sí se observó expresión en gran cantidad en la fracción insoluble, indicando la formación de cuerpos de inclusión, por lo que se decidió explorar la recuperación de la proteína a partir de esta fracción. Para ello, se realizó una producción de la quimera a mayor escala en medio TB y los cuerpos de inclusión fueron purificados en condiciones desnaturizantes. Para el re-plegamiento de la proteína, se siguió el protocolo reportado por Carlomagno *et al*[135], en el cual se explora un conjunto de condiciones de re-plegamiento mediante la combinación de diferentes buffers en un rango de pH 5-11, y diferentes aditivos (arginina 0,2-1 M, sacarosa 0,2-1 M, glicerol 4-40% y PEG 5-20%). La eficiencia del re-plegamiento fue evaluada midiendo la actividad de NanoLuc en las diferentes condiciones, utilizando como referencia la actividad en PBS del NbA2-NanoLuc previamente producido. La actividad luciferasa no pudo ser recuperada en forma significativa en ninguna de las condiciones, encontrándose en un rango de 0,4-1,3% de la actividad del clon de referencia (figura 33).

Si bien se exploró un rango amplio de soluciones para el re-plegamiento en cuanto al pH y uso de aditivos, es posible que modificar otros aspectos mejore la eficiencia de re-plegamiento. Por ejemplo, podrían explorarse agentes alternativos a la urea para la solubilización de los cuerpos de inclusión. Por otra parte, en el ensayo realizado el cambio hacia los buffers de re-plegamiento se realizó por dilución de la proteína en buffer, pero es posible que métodos más graduales favorezcan el re-plegamiento, como ser la diálisis o la aplicación de un gradiente entre ambas soluciones sobre la proteína inmovilizada en una columna de afinidad. De todas formas, estos resultados están en línea con un reporte previo que indica que NanoLuc no es capaz de re-plegarse en forma eficiente. En un estudio de molécula única llevado a cabo por Ding *et al*[149], una construcción de tres repetidos en tándem de NanoLuc fue sometida a desnaturalización por medios mecánicos. En estas condiciones, la enzima sólo pudo re-plegarse correctamente 16,9% de las veces. Considerando todo esto, continuar explorando el re-plegamiento de esta quimera no resultaba prometedor, por lo que se decidió ensayar la expresión en otro hospedero.

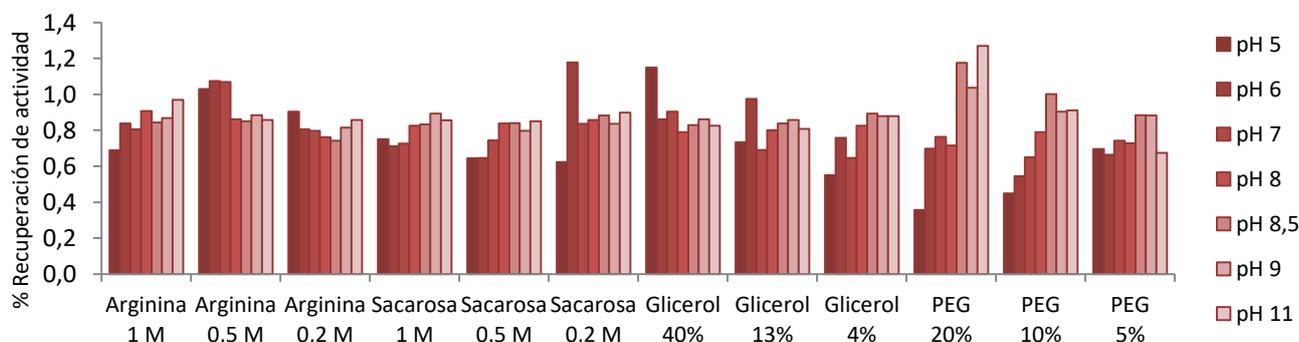


Figura 33 | Actividad luciferasa de la quimera NbON10-NanoLuc bajo diferentes condiciones de re-plegamiento. Los resultados se muestran como porcentaje de actividad con respecto al NbA2-NanoLuc en estado nativo en PBS.

Se recurrió a la expresión de esta construcción utilizando como hospedero la línea celular HEK293T, que fue originalmente derivada de células de riñón embrionario humano y es ampliamente utilizada para la expresión de proteínas recombinantes[150, 151]. La secuencia de NbON10-NanoLuc fue optimizada para su expresión en células humanas, clonada en el vector pcDNA3.1(+) y transfectada en células HEK293T. La transfección fue realizada con PEI, y se evaluaron tres condiciones de transfección (variando la relación de masa PEI:ADN) para maximizar el rendimiento de expresión, el cual fue evaluado midiendo la actividad luciferasa en el medio de cultivo (ya que la proteína es secretada) (**figura 34A**). Si bien a bajas diluciones del medio de cultivo se observó que el mismo interfería en la generación de señal luminiscente, a mayores diluciones se pudo comparar el nivel de expresión de la quimera en las distintas condiciones, no observándose grandes diferencias. Se seleccionó la condición en la cual se observó la máxima señal en el medio de cultivo (relación de masa PEI:ADN 5:1) y se realizó una expresión transitoria durante cuatro días a mayor escala. Luego de una purificación mediante el sistema Strep-Tactin XT/Twin-Strep-tag se obtuvieron 17,6 mg de proteína por litro de medio de cultivo, con muy buena pureza (**figura 34B**).

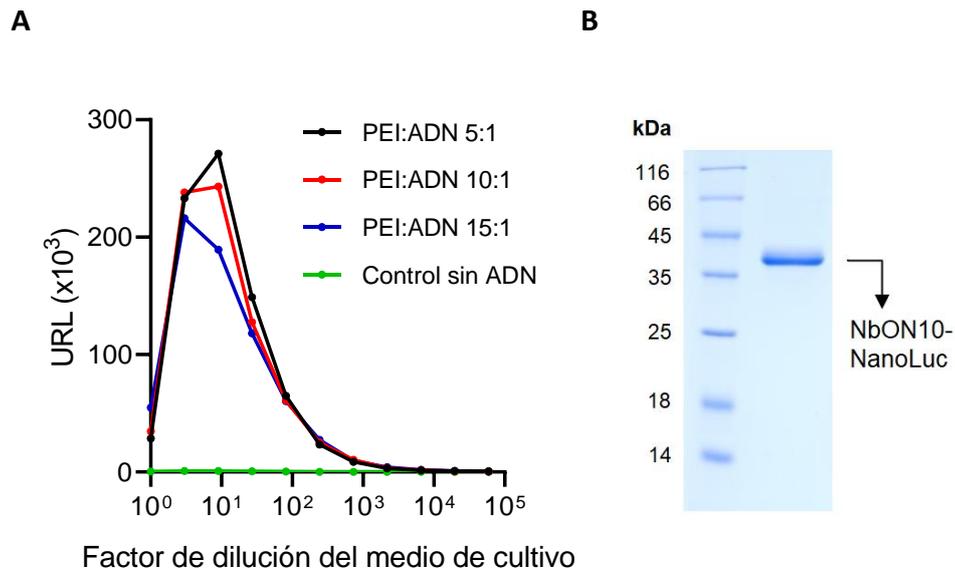


Figura 34 | Expresión de NbON10-NanoLuc en células HEK293T. (A) Evaluación de diferentes relaciones de masa ADN:PEI para la transfección. **(B)** Electroforesis SDS-PAGE de NbON10-NanoLuc purificado.

2.3.2 Evaluación analítica del ELISA luminiscente

En forma similar a lo realizado anteriormente, se construyó una curva de titulación de la proteína N recombinante para evaluar la sensibilidad analítica del ensayo (**figura 35**). Se determinó el límite de detección como el valor promedio de la señal del blanco (determinada en ausencia de antígeno) más tres veces el valor de la desviación estándar, obteniéndose un valor de 61 pg/mL. Este valor representa una mejora del doble en la sensibilidad con respecto al ensayo colorimétrico, una mejora importante aunque menos pronunciada que las reportadas en otros casos en que se ha comparado el uso de NanoLuc con la detección colorimétrica[30, 31].

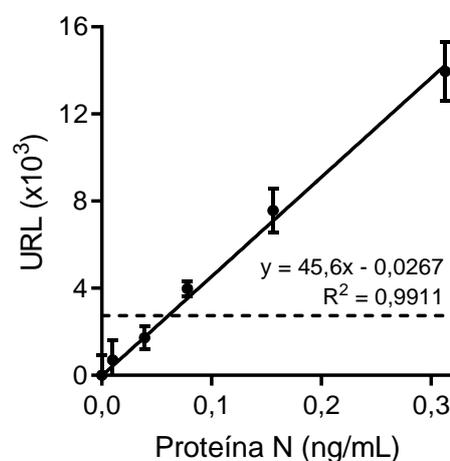


Figura 35 | Curva de titulación de antígeno con el ensayo ELISA luminiscente. Se analizaron diluciones seriadas de proteína N; se grafica el promedio de cuadruplicados y las barras de error corresponden a la

desviación estándar. La línea punteada representa el límite de detección, calculado como el valor promedio de señal luminiscente del blanco más 3 veces la desviación estándar.

2.3.3 Determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo luminiscente

En este punto, se buscó determinar si el aumento observado en la sensibilidad analítica con respecto al ensayo colorimétrico se traducía en una diferencia en la sensibilidad diagnóstica. Para ello, se analizó el mismo panel de 19 muestras positivas y 10 negativas, y los resultados fueron analizados mediante la construcción de una curva ROC (**figura 36**). Nuevamente se seleccionó un valor de corte tal que la especificidad del ensayo fuera del 100% (IC 95%: 69,2%-100,0%), dando lugar a una sensibilidad de 84,2% (IC 95%: 60,4%-96,6%), identificando correctamente 16 de las 19 muestras positivas. Este valor de sensibilidad diagnóstica es superior al obtenido para el mismo panel de muestras con el ensayo colorimétrico (68,4%, IC 95%: 43,5%-87,4%), mostrando que la duplicación de la sensibilidad analítica al utilizar la NanoLuc como reportera se tradujo en un importante incremento en la sensibilidad diagnóstica.

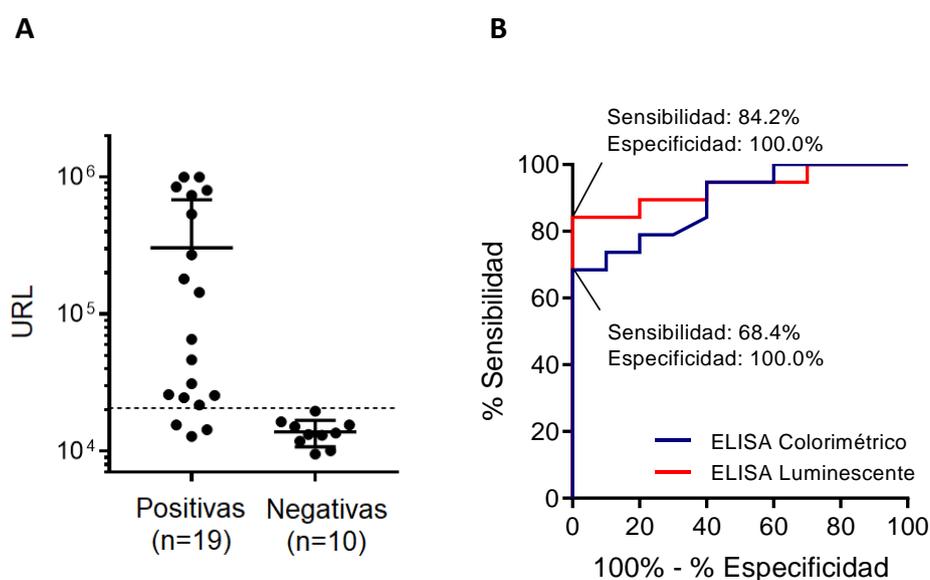


Figura 36 | Análisis mediante ELISA luminiscente del panel de muestras de hisopado nasofaríngeo previamente analizado mediante ELISA colorimétrico (figura 30). (A) Detección de proteína N en muestras previamente clasificadas como positivas (n=19) o negativas (n=10) mediante RT-qPCR. El valor de corte mostrado (línea punteada) fue determinado a través del análisis de curva ROC. **(B)** Análisis de los mismos datos a través de una curva ROC. Se incluye para comparación la curva correspondiente al ensayo colorimétrico.

A continuación, con el propósito de establecer con mayor precisión el valor de corte del ensayo y por lo tanto su sensibilidad y especificidad diagnóstica, se realizó un análisis de

muestras más riguroso. Para ello, se trabajó con un panel más amplio de muestras, constituido por 47 muestras positivas y 68 muestras negativas, obtenidas en un período acotado de tiempo (marzo-abril 2022). Al igual que las muestras previamente analizadas, se trató de alícuotas de descarte sin identificar proporcionadas por la empresa ATGen, con el Ct obtenido de la RT-qPCR como único dato asociado. Luego del análisis mediante ELISA luminiscente, se construyó una curva ROC, y fijando la especificidad en 100% (IC 95%: 94,7%-100,0%) se determinó una sensibilidad de 78,7% (IC 95%: 64,3%-89,3%), identificando como positivas 37 de las 47 muestras positivas por RT-qPCR (**figura 37**).

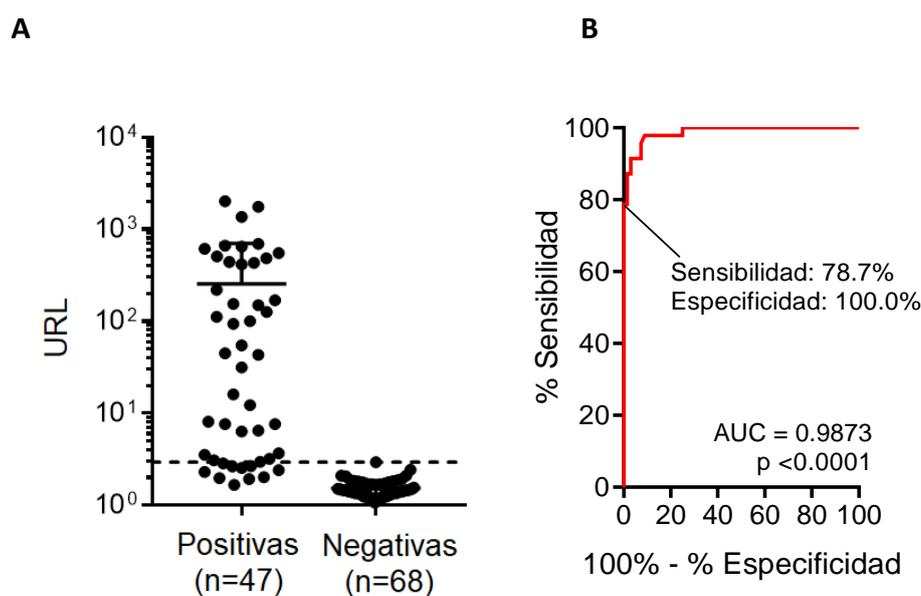


Figura 37 | Evaluación del ensayo ELISA luminiscente. (A) Análisis de muestras de hisopado nasofaríngeo previamente clasificadas como positivas (n=47) o negativas (n=68) mediante RT-qPCR. El valor de corte mostrado (línea punteada) fue determinado a través del análisis de curva ROC. **(B)** Análisis de los mismos datos a través de una curva ROC.

Teniendo en cuenta que el valor de corte se estableció sobre la base de una especificidad absoluta (100%), el ensayo presenta una muy buena sensibilidad. Resulta difícil compararla con la sensibilidad de tests de antígeno disponibles comercialmente, ya que cuando los mismos son evaluados por laboratorios independientes con diferentes paneles de muestras, los resultados pueden diferir significativamente. En un meta-análisis realizado por el grupo Cochrane[152], donde se tomaron en cuenta estudios independientes del desempeño de diferentes tests de antígeno comerciales, se determinó una sensibilidad promedio de 69,3% (IC 95%: 66,2%-72,3%) y una especificidad promedio de 99,3% (IC 95%: 99,2%-99,3%). Al enfocar el análisis en las diferentes marcas comerciales, se determinó que las sensibilidades promedio presentaban un rango entre 34,3% y 91,3% para pacientes sintomáticos y entre 28,6% y 77,8% para pacientes asintomáticos. A modo de ejemplo, en la tabla 1 se resumen los resultados obtenidos para dos de los tests de antígeno utilizados en Uruguay (de las empresas Abbott y SD Biosensor-Roche).

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de dos tests de antígeno utilizados en Uruguay. Se comparan los valores derivados de un meta-análisis realizado por el grupo Cochrane[152] y los reportados por los fabricantes[153, 154].

	Grupo Cochrane				Fabricante	
	Sensibilidad (%)		Especificidad (%)		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
	Sintomáticos	Asintomáticos	Sintomáticos	Asintomáticos		
Abbott	77,3	57,9	99,7	99,6	91,4	99,8
SD Biosensor-Roche	84,0	64,6	99,2	99,6	95,5	99,2

Por otra parte, el ensayo mostró una alta especificidad. En relación a esto, la inclusión del clon H4 como nanobody de captura es deseable dado que, a diferencia de D5 y ON10, es reactivo contra la región menos conservada de la proteína N (NΔ121). Por lo tanto, se espera que no sea reactivo contra la proteína N de otros coronavirus endémicos, contribuyendo a la especificidad del ensayo en caso de haber pacientes que estén cursando una infección por uno de estos virus.

Al analizar la intensidad de la señal obtenida en función del Ct previamente determinado para las muestras mediante RT-qPCR, se observó una correlación entre valores de Ct más bajos y mayores intensidades de señal (**figura 38A**). Al considerar únicamente las muestras de Ct <24, la sensibilidad del ensayo alcanza el 97,3% (IC 95%: 85,8%-99,9%) (**figura 38B**). Este punto es de particular relevancia, ya que se ha demostrado que los valores más bajos de Ct correlacionan con la positividad en cultivo celular, que es el mejor método disponible para determinar la presencia de virus viable[155, 156]. La correcta clasificación de estas muestras como positivas es esencial para identificar aquellos pacientes que atraviesan el período de máximo riesgo de contagio.

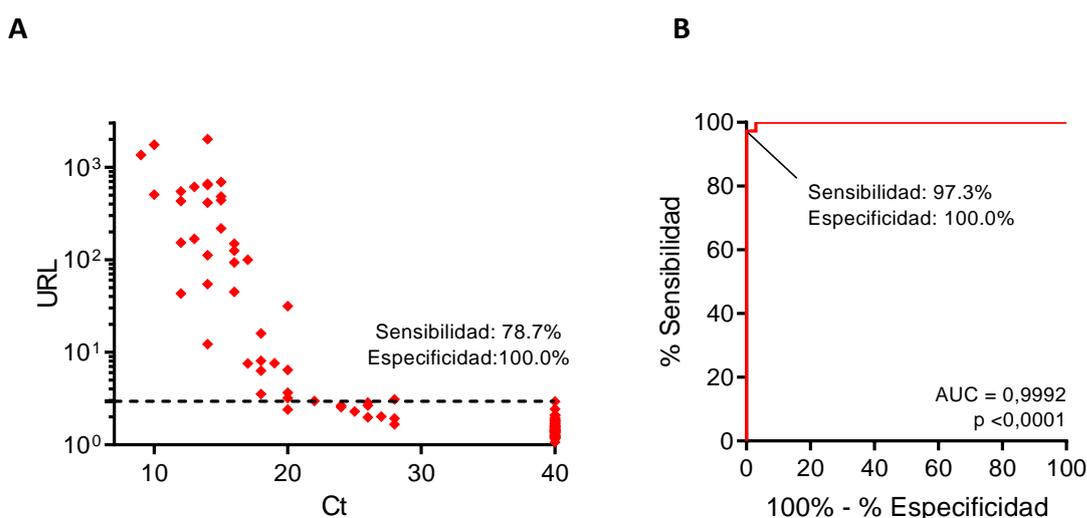


Figura 38 | Relación entre la señal generada en el ensayo luminiscente y el Ct de las muestras. (A) Señal luminiscente graficada en función de los valores de Ct determinados mediante RT-qPCR. El valor de corte mostrado (línea punteada) fue determinado previamente a través del análisis de curva ROC. **(B)**

Curva ROC del análisis de muestras, considerando dentro de las muestras positivas sólo aquellas de Ct <24.

En los análisis de muestras aquí presentados, se seleccionaron en todos los casos valores de corte tales que la especificidad fuera de 100,0%. Sin embargo, es posible la selección de valores de corte alternativos que prioricen un aumento en la sensibilidad, aunque esto implique una concomitante disminución en la especificidad. Esto podría ser preferible, por ejemplo, en un contexto en que el aislamiento de pacientes infectados sea la prioridad. En cualquier caso, el balance óptimo entre estos dos parámetros siempre dependerá del contexto epidemiológico, así como de los protocolos de testeo establecidos. Factores como la población que será testeada (población general o pacientes sintomáticos), la prevalencia de la infección en la población y la presencia o ausencia de ensayos confirmatorios por RT-qPCR influirán en la priorización de la sensibilidad o especificidad del ensayo[118].

2.3.4 Efectividad del ensayo en la detección de variantes de SARS-CoV-2

La emergencia de variantes de SARS-CoV-2 a lo largo de la pandemia de COVID-19, en particular subvariantes del linaje Omicron, constituyó un desafío constante al desarrollo tanto de vacunas como de terapias basadas en anticuerpos monoclonales. Incluso las vacunas diseñadas para generar protección contra la subvariante Omicron BA.5 no generaron respuestas capaces de neutralizar eficazmente subvariantes que emergieron posteriormente, como Omicron BQ y XBB[157]. Estas mismas subvariantes tampoco eran neutralizadas por la mayoría de los anticuerpos monoclonales terapéuticos disponibles al momento de su emergencia[158]. Cabe destacar que ambos tipos de terapia tienen como blanco principal la proteína Spike, que por situarse en la superficie de la partícula viral se encuentra sometida a una gran presión selectiva y por lo tanto presenta una alta tasa de mutación. Si bien la presión selectiva sobre la proteína N es menor, presenta ciertas mutaciones respecto al linaje ancestral, y se ha reportado que la sensibilidad en la detección de proteína N recombinante disminuye cuando presenta mutaciones asociadas a variantes[159, 160]. Por este motivo, resultó importante determinar si el ensayo desarrollado era capaz de detectar la proteína N de otras variantes.

Al momento de evaluar este ensayo (abril de 2022), el linaje Omicron era dominante a nivel internacional, representando casi el 100% de las secuencias reportadas en la base de datos GISAID[161]. Con el objetivo de determinar la capacidad del ensayo de detectar la proteína N de esta variante se utilizó una proteína N recombinante correspondiente a la subvariante BA.5, por ser la que presentaba más mutaciones dentro de las subvariantes circulantes en ese momento. Además, las mutaciones que presentaba (P13L, D31-33, E136D, R203K, G204R, S413R) eran compartidas por el resto de las subvariantes circulantes (y también son las mutaciones presentes en las subvariantes BQ.1, BQ.1.1 y XBB surgidas posteriormente)[162]. Al realizar curvas de titulación con esta proteína, se encontró que el ensayo era capaz de detectarla, generando lecturas similares a la proteína de referencia (**figura 39**).

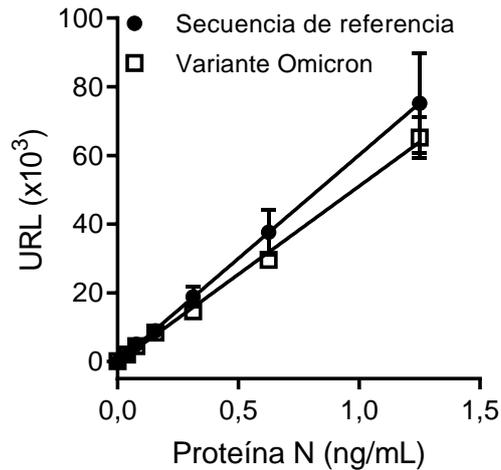


Figura 39 | Detección de proteína N de las variantes ancestral y Omicron BA.5 de SARS-CoV-2. La variante BA.5 posee las mutaciones P13L, D31-33, E136D, R203K, G204R y S413R; en este conjunto están incluidas todas las mutaciones encontradas en las demás subvariantes de Omicron de mayor circulación.

Cabe destacar que las muestras utilizadas para la evaluación de este ensayo (**figura 37**) fueron recolectadas en Marzo-Abril de 2022, y por lo tanto representan el panorama epidemiológico de Uruguay en ese momento. En este período la variante Omicron ya era dominante, en particular la subvariante BA.1, que constituía casi el 100% de los nuevos casos reportados[137]. Si bien no se realizó una secuenciación de las muestras positivas analizadas, dada la prevalencia de esta variante en el país es altamente probable que las muestras correspondieran a Omicron y, por ende, que la sensibilidad diagnóstica determinada corresponda a la detección de la proteína N de esta variante.

Los resultados presentados en este capítulo dieron lugar a la publicación: **“A highly sensitive nanobody-based immunoassay detecting SARS-CoV-2 nucleocapsid protein using all-recombinant reagents”**, Paula Segovia-de Los Santos, Carolina Padula-Roca, Ximena Simon, Cesar Echaidés, Gabriel Lassabe, Gualberto Gonzalez-Sapienza. *Frontiers in Immunology*, 2023 v.: 14:1220477 (adjunta al final de esta tesis).

Capítulo 3: Exploración de un método de screening masivo de nanobodies utilizando bibliotecas de quimeras nanobody-NanoLuc

En el capítulo anterior, pudimos demostrar que la implementación de una quimera nanobody-NanoLuc dio lugar a un ensayo luminiscente con una sensibilidad diagnóstica superior al ensayo colorimétrico. La producción de quimeras de este tipo presenta la ventaja adicional de permitir detectar en forma directa la presencia de nanobodies, prescindiendo de anticuerpos secundarios. Considerando esto, se decidió explorar el potencial de estas construcciones para facilitar la selección de pares de nanobodies para la detección de antígenos mediante inmunoensayos de captura, lo cual podría presentar numerosas ventajas.

En efecto, en el ejemplo anterior se seleccionaron clones individuales contra la proteína N, que debieron producirse y purificarse individualmente, para posteriormente verificar en forma individual cuáles de ellos constituyen pares capaces de detectar el antígeno en un formato de captura. Esto implica un importante volumen de trabajo y resulta en una exploración parcial del repertorio de nanobodies disponible. Ante estas limitaciones, en esta etapa de la tesis se desarrolló una estrategia de selección de pares de nanobodies que procede de forma más directa y empírica, en dos etapas: inicialmente, se utiliza como molécula selectora durante el panning el inmunocomplejo formado por el nanobody de captura y el antígeno, y posteriormente se realiza la selección del nanobody de detección en formato high-throughput, haciendo uso de las posibilidades que ofrecen las quimeras nanobody-NanoLuc. La estrategia se esquematiza en la **figura 40**. En este método, las condiciones de selección durante el panning se asemejan al formato en que el nanobody de detección será utilizado, favoreciendo la obtención de clones con las propiedades optimizadas.

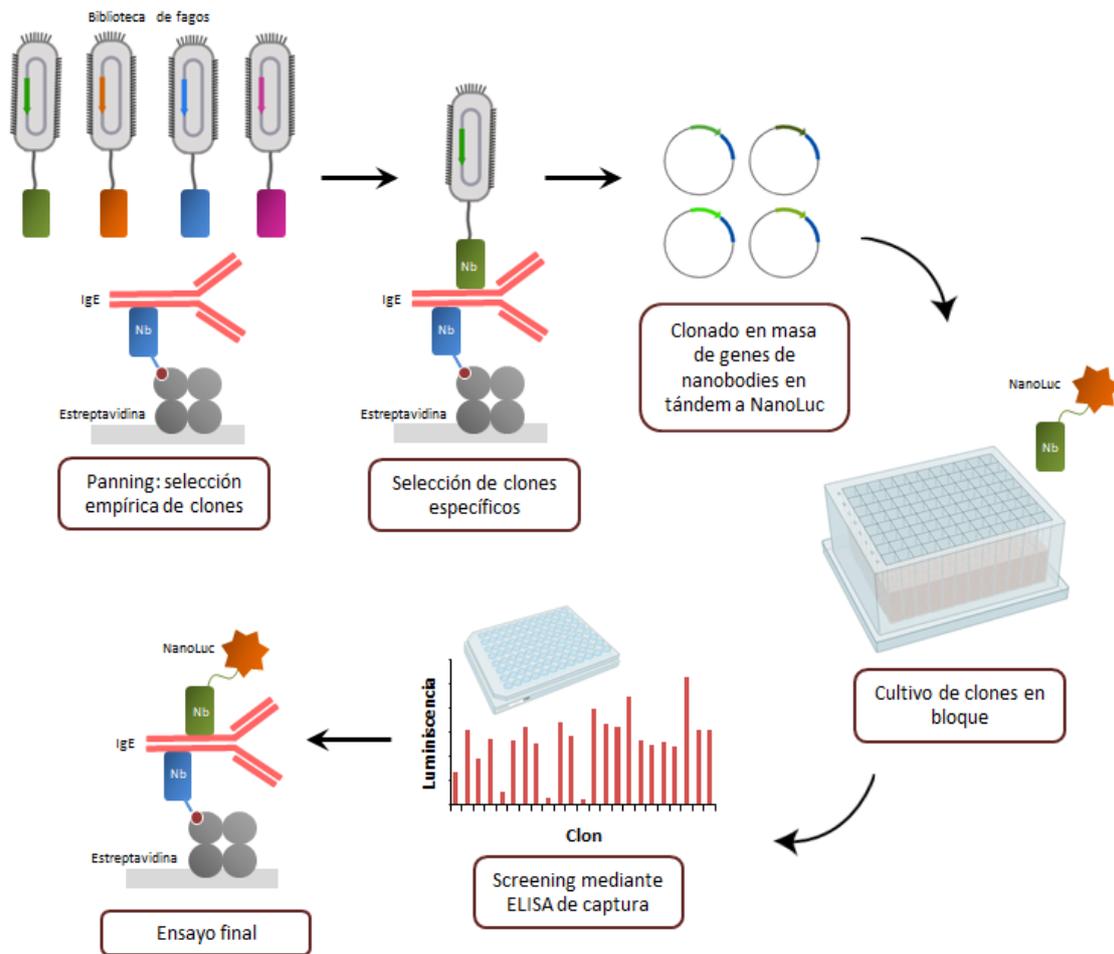


Figura 40 | Esquema del proceso de selección empírica de pares de nanobodies para la detección de biomarcadores (en este ejemplo IgE) basado en el uso de quimeras Nb-NanoLuc.

Como modelo se trabajó en la detección de IgE humana, cuya cuantificación en suero posee gran relevancia a nivel clínico dado su rol en el diagnóstico de enfermedades alérgicas mediadas por IgE. Luego de obtener un output desde el cual seleccionar nanobodies de detección, se implementó un método de screening que permitiera, mediante la generación de quimeras de diferentes clones nanobody-NanoLuc, la identificación de aquellas capaces de detectar el antígeno capturado por el clon inicial. Para ello, el pool de genes obtenido del segundo panning fue clonado en el vector pINQ-NanoLuc para producir quimeras de un alto número de clones en paralelo. Además de simplificar el ensayo de screening eliminando la necesidad de utilizar un anticuerpo secundario para detectar los nanobodies, una gran ventaja de esta estrategia es que permitiría estimar la concentración de las quimeras utilizando como indicador la actividad enzimática de NanoLuc en los extractos. Este aspecto es de gran importancia ya que en un screening basado en extractos celulares, la señal observada estará determinada tanto por la afinidad de los clones como por su concentración (determinada por su nivel de expresión). Por este motivo, lograr determinar la concentración de estas quimeras permitiría evaluar la “contribución” del nivel de expresión de cada clon a la reactividad observada.

Otra posible ventaja asociada a esta estrategia se vincula al mayor rango dinámico que presenta la señal luminiscente con respecto a la colorimétrica (**figura 14**). Al realizar screenings de este tipo en formato colorimétrico (como se realizó en el capítulo 2) es esencial analizar los extractos celulares en diferentes diluciones para lograr distinguir clones cuyo nivel de señal se destaque. En el caso de un screening con señal luminiscente, se espera que el análisis de una única dilución de los extractos sea suficiente para observar diferencias entre clones.

3.1 Inmunización de una llama y construcción de la biblioteca de Phage Display

Para la construcción de la biblioteca de fagos descrita en el capítulo anterior, al momento de la inmunización con proteína N la llama fue inmunizada además con dos dosis de IgE humana monoclonal en adyuvante incompleto de Freund, con un período de 15 días entre dosis. El objetivo de esta co-inmunización fue la construcción de una única biblioteca que permitiera la selección de clones específicos contra ambos antígenos. En ese entonces, no se disponía de reactivos adecuados para determinar el título de anticuerpos contra IgE, pero se continuó de todas formas con la construcción de la biblioteca ya que en la experiencia previa del grupo las respuestas obtenidas con esta estrategia de inmunización suelen ser suficientes para el aislamiento de clones. Sin embargo, estando ya avanzada la construcción de la biblioteca se determinó que el título de anticuerpos anti-IgE humana no era bueno, por lo que se decidió proseguir con la selección de clones anti-proteína N y posteriormente generar una nueva biblioteca para la selección de clones anti-IgE.

Aproximadamente un año después se administraron a la misma llama tres dosis adicionales de IgE humana monoclonal. La respuesta de anticuerpos obtenida en esta oportunidad fue rápida y se obtuvieron títulos altos de anticuerpos, indicando un fuerte efecto *booster* (**figura 41**). El mismo fue particularmente pronunciado y, como se verá más adelante, este protocolo de inmunización puede haber fomentado procesos de maduración de la afinidad asociados al mantenimiento de la actividad del centro germinal meses post-inmunización, con la concomitante acumulación de mutaciones y presión selectiva sobre las células B de memoria[163]. Al analizar el título de los dos últimos sueros extraídos, se observó una saturación en la respuesta. En este punto se procedió a la extracción de 200 mL de sangre para la construcción de la biblioteca de fagos. A partir de 2×10^7 células mononucleares de sangre periférica y mediante procedimientos similares a los descritos anteriormente, se obtuvo una biblioteca de 3×10^7 transformantes.

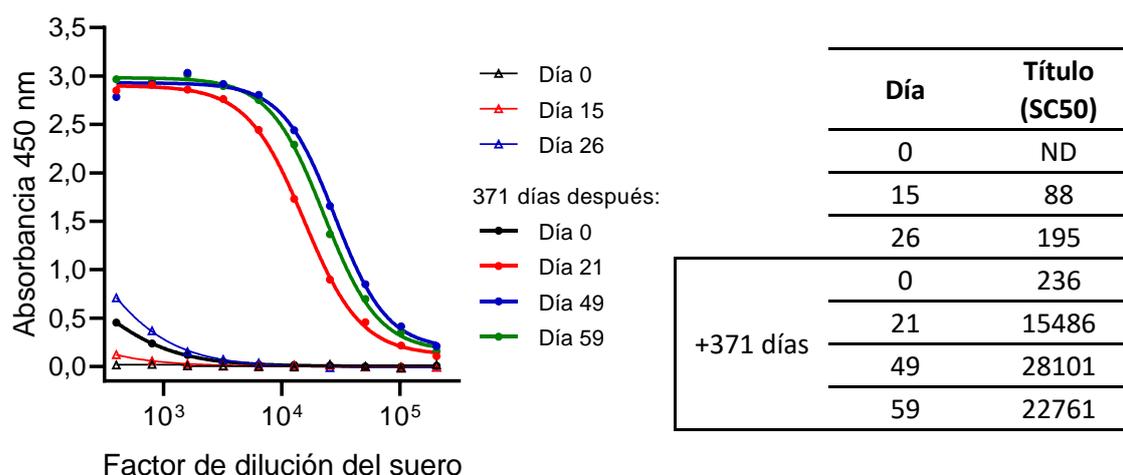


Figura 41 | Titulación de anticuerpos contra IgE en sueros de la llama inmunizada. La titulación se realizó mediante un ELISA en que los sueros fueron incubados sobre pocillos sensibilizados con el antígeno de inmunización, revelando el ensayo con un anticuerpo monoclonal anti-VHH conjugado a peroxidasa. El título fue definido como el factor de dilución del suero que da lugar al 50% de la señal máxima de acuerdo al ajuste sigmoide de las curvas de titulación (SC50). ND: No determinado.

3.2 Selección del nanobody de captura

Para la obtención de clones anti-IgE que puedan ser útiles en la detección de IgE en suero, deben tenerse en cuenta dos aspectos de gran importancia. En primer lugar, sus epítopes deben encontrarse en la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Dado que para la inmunización se utilizó IgE monoclonal (porque no se contaba con IgE policlonal en la cantidad necesaria), se espera que la respuesta de anticuerpos de la llama se encuentre sesgada hacia clones que reconozcan el parátipe de la IgE utilizada para inmunizar. Para evitar la selección de estos clones, se utilizó como antígeno de selección en el panning IgE policlonal.

En segundo lugar, a la hora de seleccionar estos clones es esencial asegurar que los mismos no presenten reactividad cruzada contra otras inmunoglobulinas humanas. Esto es de particular importancia dado que IgE es la inmunoglobulina minoritaria en sangre, siendo su concentración promedio 6 órdenes de magnitud menor que la de la inmunoglobulina más abundante, IgG[126]. Por este motivo, a la hora de cuantificar IgE en suero, incluso un bajo grado de reactividad cruzada con otras inmunoglobulinas puede implicar una gran interferencia. Para eliminar de la biblioteca aquellos clones que presentaran reactividad cruzada, se realizó una pre-adsorción de la misma sobre pocillos de ELISA de alta adherencia sensibilizados con un conjunto de inmunoglobulinas humanas IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgA. Este mismo pool fue además co-incubado con la biblioteca sobre los pocillos sensibilizados con IgE a la hora de realizar el panning.

Se realizaron dos rondas de panning. El conjunto de fagos obtenidos luego de la segunda ronda (output 2) fue evaluado realizando un screening mediante ensayo ELISA de 12 clones seleccionados aleatoriamente. Se determinó que 10 de los 12 clones presentaban reactividad

contra IgE, y de éstos ninguno presentaba reactividad cruzada contra otras inmunoglobulinas humanas (**figura 42**). Los 10 clones positivos obtenidos fueron secuenciados, y llamativamente se encontraron sólo dos secuencias diferentes (clones #2 y #3), incluyendo un clon ampliamente dominante (clon #3) correspondiente a 9 de las 10 secuencias obtenidas. Ambos nanobodies corresponden a dominios VHH².

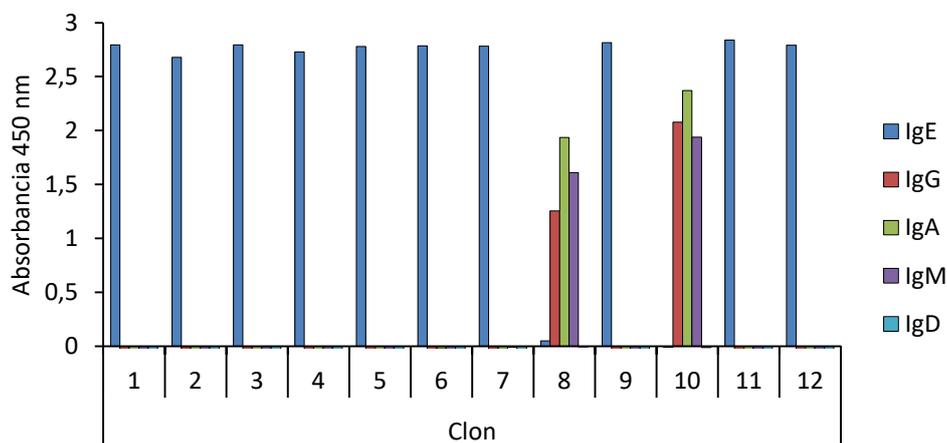


Figura 42 | Screening de 12 clones obtenidos luego de dos rondas de panning anti-IgE. Se incubaron sobrenadantes de cultivo sobre pocillos de ELISA sensibilizados con IgE y otras inmunoglobulinas humanas, y el ensayo fue revelado con un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa.

Para determinar si los clones #2 y #3 eran candidatos adecuados para utilizarse como nanobodies de captura, se evaluaron dos condiciones necesarias: poder ser producidos con buen rendimiento y presentar alta afinidad. Para ello, sus secuencias codificantes fueron clonadas en el vector pINQ-BtH6, y en primer lugar se determinaron las condiciones óptimas para su expresión realizando cultivos a pequeña escala (5 mL) en medio LB (**figura 43A**). En la electroforesis SDS-PAGE de los extractos celulares se pudo observar la expresión de ambos clones en la fracción soluble. Las condiciones de óptima expresión fueron inducción con IPTG 10 μ M a 28 °C para el clon #2, e IPTG 100 μ M a 28 °C para el clon #3. A continuación, estos nanobodies fueron producidos a mayor escala (250 mL) y purificados por afinidad en columna de Ni-NTA. Los clones fueron obtenidos con buena pureza y muy altos rendimientos (**figura 43B**), obteniéndose luego de la purificación 79,2 y 117,2 mg por litro de cultivo para los clones #2 y #3 respectivamente.

² Las secuencias obtenidas en este capítulo son pasibles de protección, por lo cual no se incluyen en este documento.

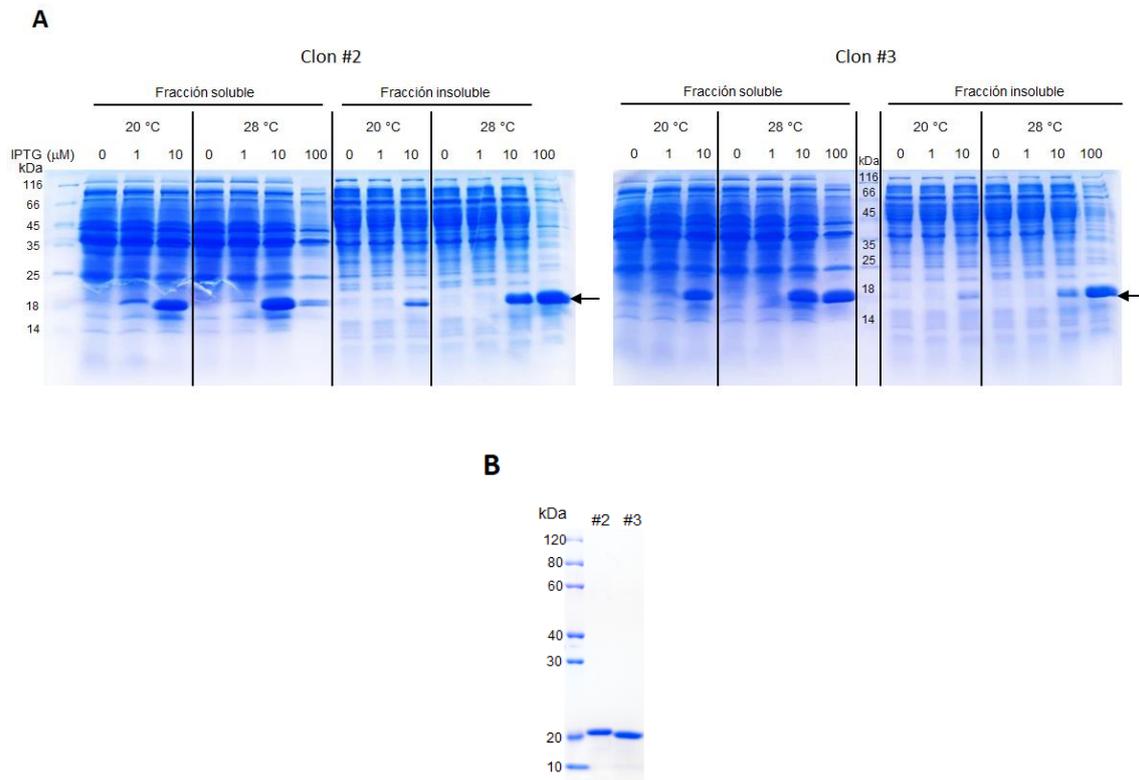


Figura 43 | Producción de los clones anti-IgE #2 y #3 desde el vector pINQ-BtH6. (A) Electroforesis SDS-PAGE de extractos celulares de cultivos bacterianos, correspondientes a ensayos de expresión a pequeña escala (cultivos de 5 mL en medio LB). Se indica en cada caso con una flecha la altura de las bandas correspondientes a la proteína de interés. **(B)** Electroforesis SDS-PAGE de los nanobodies purificados.

A continuación se realizó una caracterización de los clones obtenidos mediante interferometría de biocapa utilizando el equipo BLItz. En primer lugar, se intentó determinar sus constantes de afinidad (constantes de equilibrio de disociación), inmovilizando el antígeno en forma covalente sobre los biosensores. Ambos nanobodies presentaron valores de k_{off} por debajo del límite que puede ser cuantificado por este equipo (**figura 44**), por lo cual no pudo determinarse su valor de K_D . De todas formas, puede afirmarse que sus constantes de equilibrio se encuentran por debajo 0,1 nM (límite inferior de medición del equipo), indicando que se trata de clones de muy alta afinidad.

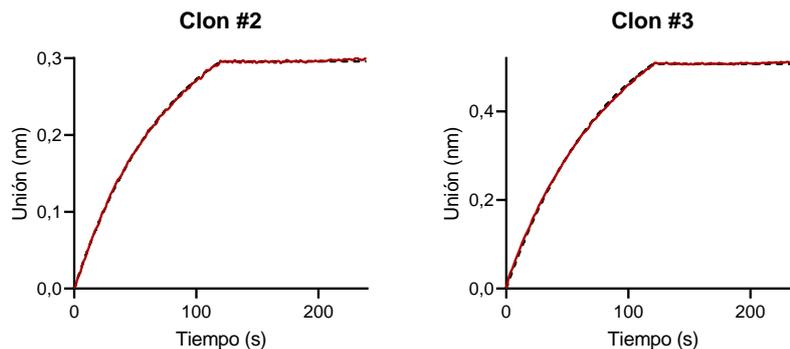


Figura 44 | Sensogramas de interferometría de biocapa obtenidos para la asociación y disociación de dos clones anti-IgE. Las medidas fueron realizadas con 100 nM de nanobody sobre sensores amino-reactivos donde IgE humana fue inmovilizada covalentemente. Los datos fueron ajustados a un modelo de unión 1:1 (línea punteada).

Finalmente, se realizó un binning de epítopes para determinar si estos dos clones poseían epítopes solapantes, en forma análoga a lo descrito anteriormente para los clones anti-proteína N. Se observó la unión secuencial de ambos clones a IgE en forma independiente del orden en el cual fueran incubados (**figura 45**), indicando que sus epítopes no son solapantes y que la unión de ambos clones puede darse en forma simultánea sin que exista un impedimento estérico.

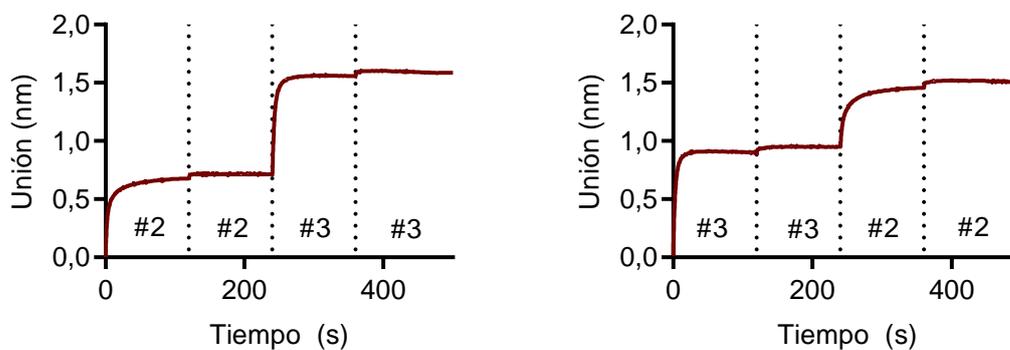


Figura 45 | Sensogramas correspondientes al binning de epítopes realizado sobre IgE humana inmovilizada covalentemente en biosensores amino-reactivos. Cada nanobody fue incubado dos veces consecutivamente para asegurar la saturación de los sitios de unión. Para confirmar la posibilidad de unión simultánea, se analizaron ambos órdenes de unión posibles.

3.3 Exploración de un método de screening masivo para la selección empírica de nanobodies de detección

Considerando la alta afinidad y especificidad de estos clones, era probable que cualquiera de ellos constituyera un buen candidato para la captura de IgE y permitiera la obtención de un ensayo de buena sensibilidad y especificidad. De estos, se eligió el clon #3 para capturar la IgE a utilizar en el panning, por ser el clon dominante en el output del panning anterior. De esta forma era posible asegurar la exclusión de este clon superabundante (dado que su epítotope estaría bloqueado por el nanobody de captura), permitiendo obtener una mayor diversidad de potenciales nanobodies de detección.

El proceso de panning se realizó a partir de la misma biblioteca de fagos filamentosos. Los pocillos de ELISA fueron sensibilizados con estreptavidina, seguido de una incubación con el clon #3 biotinilado y posteriormente IgE humana policlonal. Las estrategias descritas anteriormente para eliminar clones que presentaran reactividad cruzada contra otras inmunoglobulinas humanas fueron aplicadas nuevamente para este panning. Se realizaron dos rondas de panning, y se realizó un screening de 12 clones seleccionados aleatoriamente del output 2. En esta oportunidad se obtuvieron 9 clones con reactividad contra IgE, y de ellos ninguno presentó reactividad cruzada contra otras inmunoglobulinas humanas (**figura 46**). En este ensayo todas las inmunoglobulinas fueron inmovilizadas directamente sobre la placa, pero un ensayo realizado en paralelo con IgE capturada a través del clon #3 dio lugar a resultados equivalentes.

Al secuenciar los 9 clones reactivos contra IgE (denominados 01-09) se obtuvieron 5 secuencias únicas, una mayor diversidad de secuencias que la obtenida en el output 2 del panning anterior. Tres de estos clones (09, 07 y 01) corresponden a dominios VHH, mientras que dos de ellos (08 y 04) son dominios VH. La secuencia del clon #3 no fue encontrada dentro de estos clones, indicando que la estrategia implementada fue exitosa en excluirlo. El clon observado con mayor frecuencia en esta oportunidad (clon 09, observado 4 veces) coincide con el clon #2 obtenido anteriormente, indicando que también se trata de un clon dominante, aunque en menor medida que el clon #3. Teniendo en cuenta esto, es posible que el bloqueo del epítotope del clon #2 durante la incubación con la biblioteca en este panning hubiera permitido obtener una diversidad de clones aún mayor. La dominancia de estos clones podría explicarse por el hecho de que presentan un muy alto nivel de expresión, como se observó durante su producción a gran escala en *E. coli*.

Si bien en el output obtenido se observa una dominancia parcial del clon #2 (clon 09), se decidió seguir adelante asumiendo que la diversidad observada era suficiente para utilizar el output como modelo para la exploración del nuevo método de screening basado en quimeras nanobody-NanoLuc.

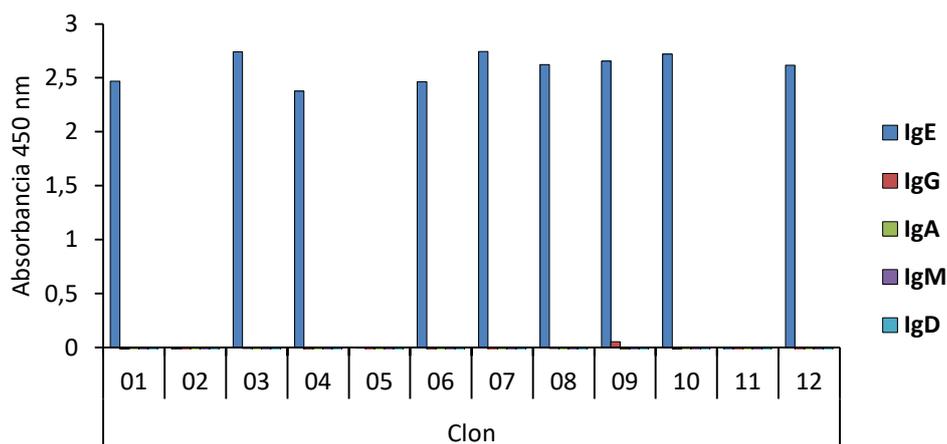


Figura 46 | Screening de 12 clones obtenidos del panning realizado contra IgE capturada por el clon #3. Se incubaron sobrenadantes de cultivo sobre pocillos de ELISA donde la IgE fue capturada por el clon #3 biotinilado, siendo éste a su vez inmovilizado a través de estreptavidina. El ensayo fue revelado utilizando un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa.

Para la realización del screening, el conjunto de genes de nanobodies obtenido del output 2 fue clonado en masa en el vector pINQ-NanoLuc, de forma de producir quimeras nanobody-NanoLuc. El plásmido resultante fue utilizado para transformar células *E. coli* BL21(DE3), y se tomaron colonias aisladas para inocular 90 cultivos en paralelo en un bloque de cultivo de 96 pocillos. Luego de obtener los extractos celulares de estos cultivos, se realizaron medidas de actividad de NanoLuc para verificar la expresión de las quimeras (**figura 47**). Se observó actividad en los 90 extractos analizados, indicando que la expresión de las quimeras fue exitosa en todos los casos. Considerando que existe una importante diversidad de clones, este resultado contrasta con la dificultad observada para la expresión en *E. coli* de la quimera NbON10-NanoLuc (**figura 32**), sugiriendo que la existencia de clones que no se expresan bien en este organismo es infrecuente. De hecho, como se verá más adelante el clon E8, que presenta la menor señal de todos los clones, pudo posteriormente ser expresado con un rendimiento aceptable. La gran variación de señal entre diferentes clones mostró que la secuencia del nanobody tiene una gran influencia en el nivel de expresión de la quimera, al igual que sucede en el caso de la expresión de nanobodies.

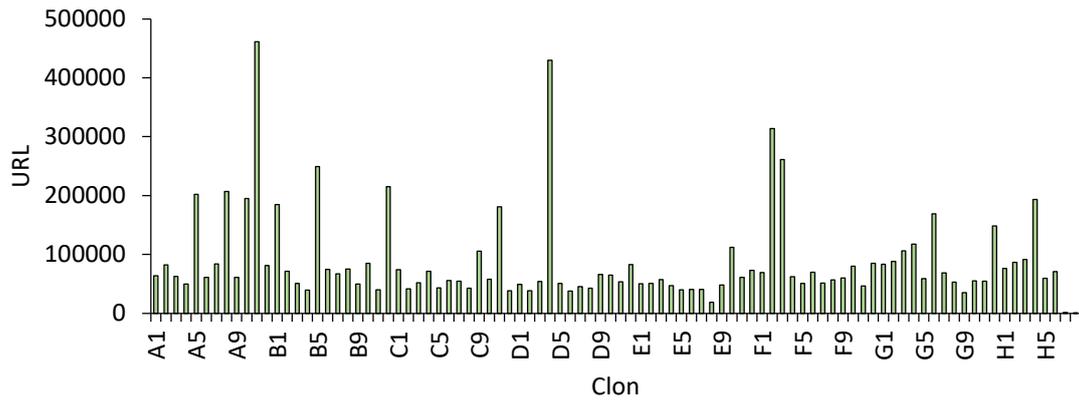


Figura 47 | Medidas de actividad de NanoLuc en los extractos celulares de 90 clones anti-IgE humana. Los extractos fueron diluidos 1/5000 en PBS para realizar la medida. Las medidas de H7 y H8 (últimas dos columnas) corresponden al blanco.

Habiendo verificado la expresión de las quimeras, el screening de potenciales nanobodies de detección fue realizado sobre pocillos de ELISA con IgE capturada utilizando el clon #3 inmovilizado a través de su unión a estreptavidina. Inicialmente, se utilizaron tres clones para evaluar ciertas condiciones para la realización del screening. Se exploró la solución bloqueante, la concentración de IgE y la dilución del extracto que se utilizaría, de forma de maximizar la relación señal/ruido (S/N) (**figura 48**). En función de estos resultados se seleccionó como condición óptima la detección de 10 ng/mL de IgE utilizando una dilución 1/100 de los extractos, utilizando como bloqueante una solución de caseína 1%-Tween 0,05%.

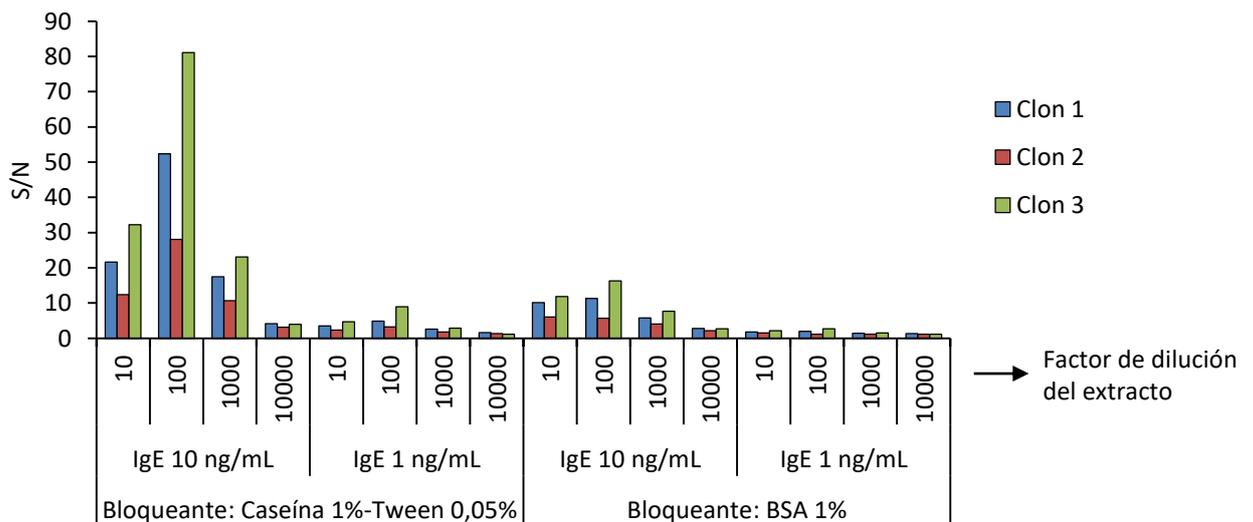


Figura 48 | Exploración de condiciones para llevar a cabo el screening de clones anti-IgE utilizando quimeras nanobody-NanoLuc. El ensayo consiste en la detección de IgE capturada por el clon #3 biotinilado, siendo éste a su vez inmovilizado sobre pocillos sensibilizados con estreptavidina. Se seleccionaron aleatoriamente los extractos celulares de tres clones para evaluar diferentes condiciones

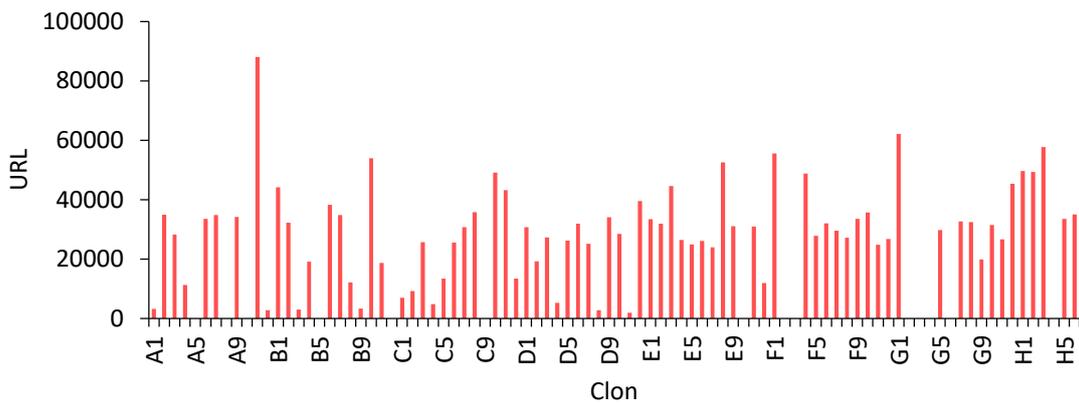
del ensayo: el bloqueante utilizado, el factor de dilución del extracto y la concentración de IgE a detectar. Se grafica la relación señal/ruido (S/N) en cada caso, siendo el ruido la señal en ausencia de IgE.

En las condiciones establecidas, se llevó a cabo el screening de 90 clones (**figura 49A**). De estos, 14 presentaron reactividad en ausencia de IgE (indicando unión a estreptavidina, el nanobody #3 y/o el bloqueante del ensayo) y fueron descartados, por lo que la señal correspondiente a estos clones no se muestra en el gráfico de la figura 49. Para los clones restantes, las diferencias en la señal observada pueden deberse tanto a diferencias en su afinidad como en su nivel de expresión, y posiblemente a diferencias en la accesibilidad de su epítipo cuando el antígeno se encuentra capturado por el nanobody #3. Asimismo existen algunos clones, como los clones A1 y A12, que presentan un muy bajo nivel de señal, indicando que no constituyen buenos pares de detección con el clon #3 o no son reactivos contra IgE.

Dado que los extractos pueden presentar distintas concentraciones de quimera, lo cual tiene un efecto sobre la señal que se generará en el screening de captura, se realizó paralelamente una estimación de su concentración correlacionándola con la actividad luciferasa del extracto. Para ello, se usó como estándar el clon NbON10-NanoLuc contra la proteína N, producido y purificado anteriormente (**figura 34**), y con estos valores se estableció la relación entre la señal generada en el screening de captura y la concentración de quimera (**figura 49B**). Este análisis permite observar si existe algún clon de alta afinidad que por tener un bajo nivel de expresión no produce una señal significativa en el análisis directo de los extractos, y que así pudiera ser ignorado. Este fue en parte el caso del clon E8, aunque no se trató de un caso extremo porque a pesar de su baja expresión presentó una señal relativamente alta en el screening de captura, que por sí misma justifica su selección.

En función de estos resultados se seleccionaron para secuenciar los 20 clones que presentaron mayor señal (**figura 49A**), así como otros 10 clones complementarios con diversos niveles de señal.

A



B

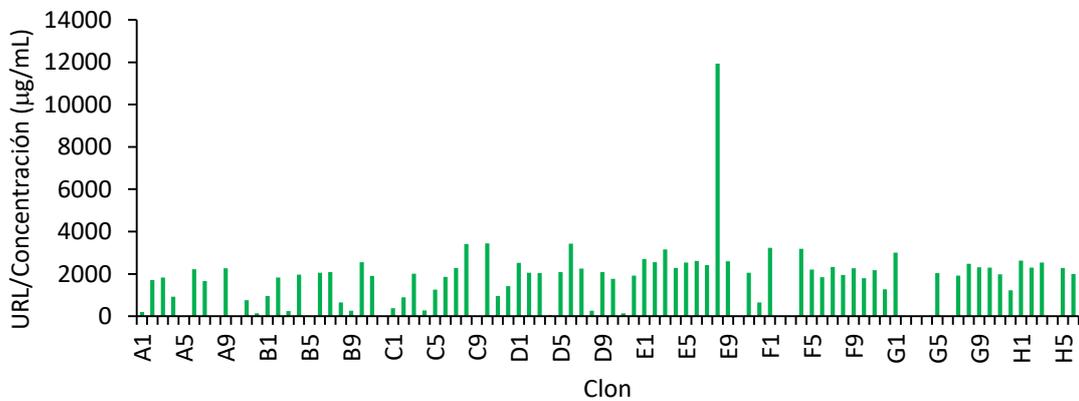


Figura 49 | Screening de 90 clones anti-IgE humana. (A) Reactividad contra IgE de los extractos celulares de cultivos bacterianos donde se indujo la expresión de quimeras Nb-NanoLuc. El antígeno fue capturado por el nanobody #3 biotinilado, siendo éste a su vez inmovilizado a través de estreptavidina. **(B)** Se grafica el cociente entre las mismas medidas de reactividad y la concentración estimada para cada extracto mediante la medida de actividad enzimática en los mismos, interpolando la señal de luminiscencia en una curva de calibración generada con NbON10-NanoLuc.

De las 30 secuencias obtenidas, una fue descartada por tratarse de un clon doble, y dentro de las 29 restantes se identificaron nueve secuencias únicas. Trece de las 29 secuencias correspondieron al clon #2 obtenido anteriormente (representadas por el clon B06), nueve correspondieron a uno de los nuevos clones (representadas por el clon B10) y los siete clones restantes fueron secuencias únicas. Las 29 secuencias pueden agruparse en seis familias de clones, asumiendo que los clones de una misma familia provienen del mismo evento de recombinación y que las diferencias menores observadas en sus CDRs responden a la diversificación por hipermutación somática.

Como se muestra en la **figura 50A**, la señal de reactividad contra IgE de clones de igual secuencia presenta un importante grado de dispersión, como se observa para el caso de los

clones B06 y B10. Las diferencias en la señal se pueden explicar por diferencias en la concentración de las quimeras presentes en los extractos (**figura 50B**). Esto podría deberse a diferencias en el tamaño del inóculo (a pesar de que se realizaron esfuerzos para estandarizar este aspecto) o a otras diferencias entre los clones (los clones agrupados por presentar secuencias casi idénticas pueden diferir en algunos nucleótidos o hasta un aminoácido en su secuencia proteica).

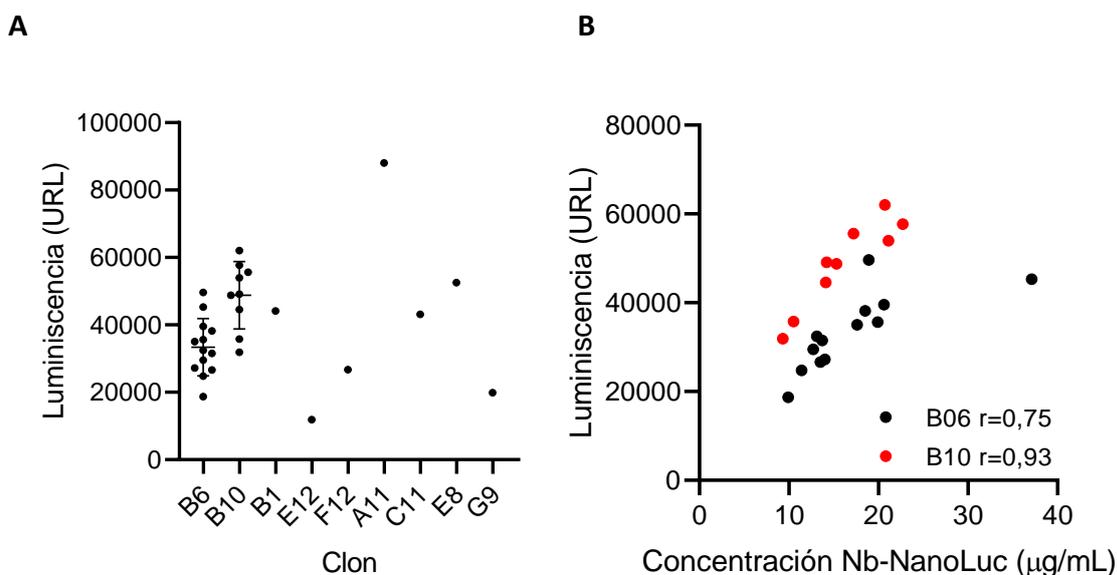


Figura 50 | Nivel de señal producido por los distintos grupos de clones. Los clones representados por B06 y B10 son los únicos que se encontraron más de una vez dentro de los clones secuenciados. **(A)** Reactividad contra IgE de extractos celulares de cultivos bacterianos (datos tomados de la **figura 49A**). **(B)** Correlación entre la reactividad contra IgE y la concentración estimada de quimera en el extracto, para los grupos de clones B06 y B10. Se muestra en el gráfico el coeficiente de correlación de Pearson.

Se decidió continuar trabajando con las seis familias de clones obtenidas, seleccionando un clon representativo de cada una para producir a mayor escala, purificar, y comparar su desempeño en la detección de IgE. Los clones seleccionados fueron A11, B06, B10, C11, E08 y F12.

Se realizaron ensayos de expresión a pequeña escala con dos de los clones seleccionados, NbA11-NanoLuc y NbF12-NanoLuc, en 5 mL de medio LB (**figura 51A**). Se pudo observar la expresión de ambos clones en la fracción soluble, siendo en ambos casos la condición óptima la expresión a 20 °C, realizando la inducción con IPTG 10 µM. Esta condición fue aplicada a la expresión a mayor escala de los seis clones seleccionados, que fueron producidos en cultivos de 250 mL de medio LB y purificados por afinidad en columna de Ni-NTA (**figura 51B**). Los rendimientos obtenidos luego de la purificación se encontraron en un rango entre 0,6 y 2,6 mg de proteína por litro de cultivo celular.

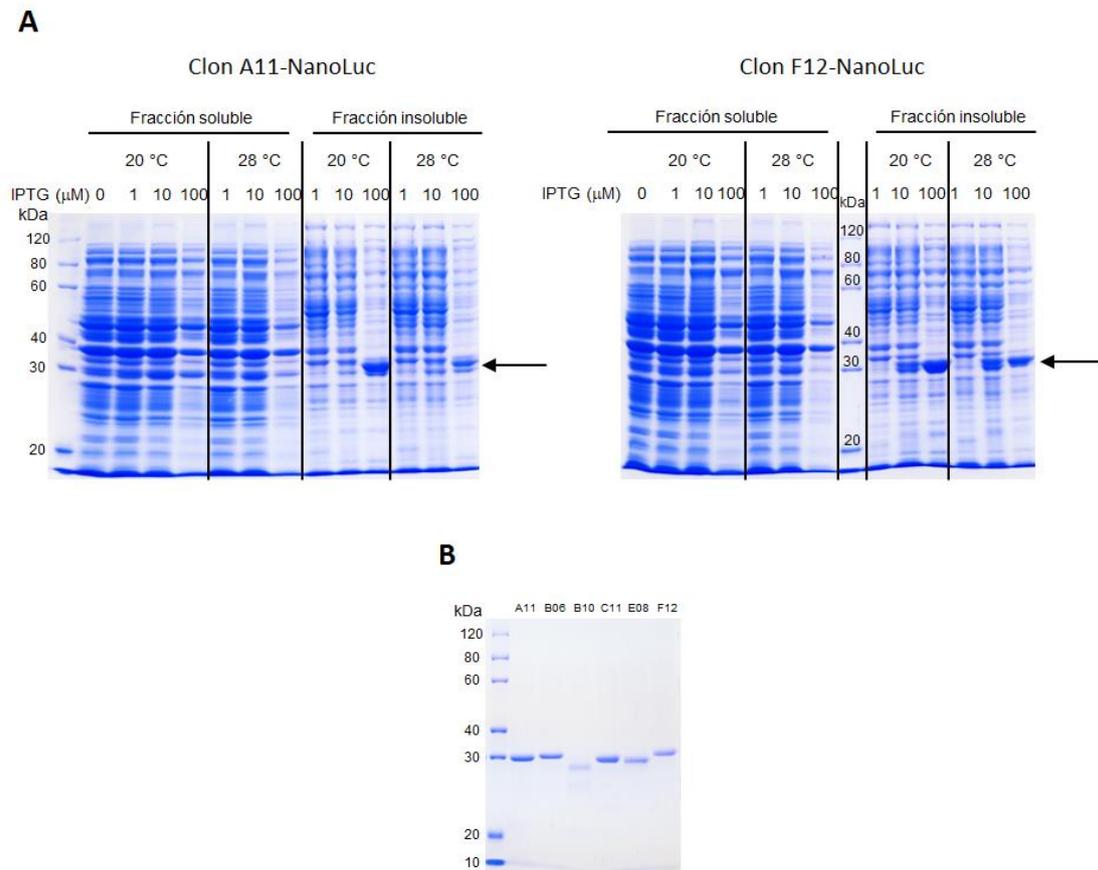


Figura 51 | Producción de seis clones anti-IgE Nb-NanoLuc. (A) Electroforesis SDS-PAGE de extractos celulares de cultivos bacterianos, correspondientes a ensayos de expresión a pequeña escala (cultivos de 5 mL en medio LB) para dos de los clones. Se indica en cada caso con una flecha la altura de las bandas correspondientes a la proteína de interés. **(B)** Electroforesis SDS-PAGE de las quimeras purificadas.

Contando con las seis quimeras purificadas, se generaron curvas de titulación de antígeno en el formato de captura, para comparar el desempeño de las mismas como reactivos de detección (**figura 52A**). Se observaron grandes diferencias en las pendientes de las curvas obtenidas para los diferentes clones, lo cual fue un resultado llamativo. Si bien esto podría deberse a diferencias en la afinidad de los nanobodies, este resultado llevó a cuestionar si la actividad específica de las quimeras (actividad enzimática por unidad de masa) podría diferir entre los distintos clones. Para responder esta pregunta, se determinó en pocillos de ELISA la actividad luciferasa de 1 ng de cada una de las quimeras. En principio, se esperaba que la actividad luciferasa fuera independiente de la secuencia del nanobody y por tanto que la actividad específica fuera igual en todas ellas, sin embargo se observó que ésta difería en forma importante entre los clones (**figura 52B**). A modo ilustrativo, el clon que produjo la mayor señal (NbA11-NanoLuc) presentó una intensidad de luminiscencia 25 veces mayor al clon que presentó la menor señal (NbF12-NanoLuc). Existía además una correlación entre la actividad específica y la sensibilidad en la detección de IgE, dado que aquellos clones cuya pendiente en la detección de IgE fue mayor (A11, C11, y B06, en orden decreciente)

coincidieron con los de mayor actividad específica. Por este motivo, era probable que las diferencias en actividad fueran la principal causa de las diferencias en la capacidad de detección de IgE, y no otros factores como la afinidad de los clones o la posición de sus epítopes.

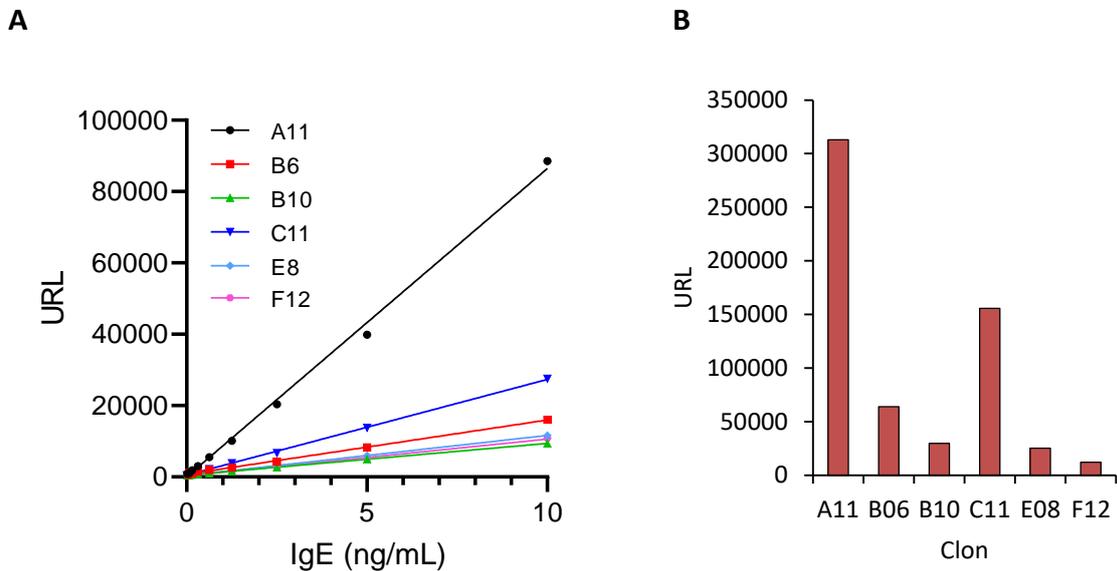


Figura 52 | Evaluación de las quimeras Nb-NanoLuc de seis clones anti-IgE. (A) Curvas de titulación de IgE humana. Se analizaron diluciones seriadas del antígeno en el formato de captura, utilizando para la detección las quimeras en una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **(B)** Medidas de actividad específica de las quimeras anti-IgE Nb-NanoLuc. Las medidas de actividad fueron realizadas con 1 ng de enzima por pocillo. Se grafica el promedio de duplicados en cada caso.

En este punto, se plantearon dos hipótesis principales para explicar este fenómeno. Por un lado, se consideró que el clon de nanobody asociado a la enzima podría afectar su actividad, en forma dependiente de su secuencia aminoacídica. Por ejemplo, regiones hipervariables dentro del nanobody, en particular el loop correspondiente a CDR3 (cuya longitud puede variar entre diferentes clones), podrían interactuar con algunas regiones de la enzima interfiriendo con su actividad. Por otro lado, la actividad de las quimeras obtenidas podría depender de algún aspecto asociado a su producción o purificación que no estuviera siendo controlado adecuadamente. Si bien los seis clones fueron expresados y purificados en iguales condiciones, su producción y purificación fue realizada a lo largo de seis semanas, en diferentes instancias.

Para estudiar esto, se decidió generar un nuevo lote de dos de los clones, A11 y B06. Dentro de este lote, se realizaron dos producciones de cada clon, realizando para cada uno dos cultivos por separado, y purificando sus productos por separado (**figura 53A**). La expresión y procesamiento fueron llevadas a cabo en paralelo, mientras que las purificaciones fueron realizadas en forma consecutiva en una misma columna de Ni-NTA. Luego de la purificación, se determinó la actividad específica de las quimeras (**figura 53B**). En el caso del clon A11, ambas producciones dentro de este segundo lote presentaron similar actividad enzimática, que a su

vez fue similar a la del primer lote de este clon. En cuanto al clon B06, la actividad fue similar entre ambas producciones del lote 2, pero aproximadamente 7 veces superior a la del lote 1. Además, la actividad del clon B06 en el lote 2 es similar a la de A11 en todas sus producciones. Este resultado sugiere que las diferencias en actividad no se relacionan al clon de nanobody que se exprese en tándem a NanoLuc, sino a algún aspecto del proceso de cultivo bacteriano, procesamiento para obtener el extracto y/o purificación de la proteína. Dado que ambos lotes fueron producidos en iguales condiciones, este factor hasta el momento no se ha podido identificar.

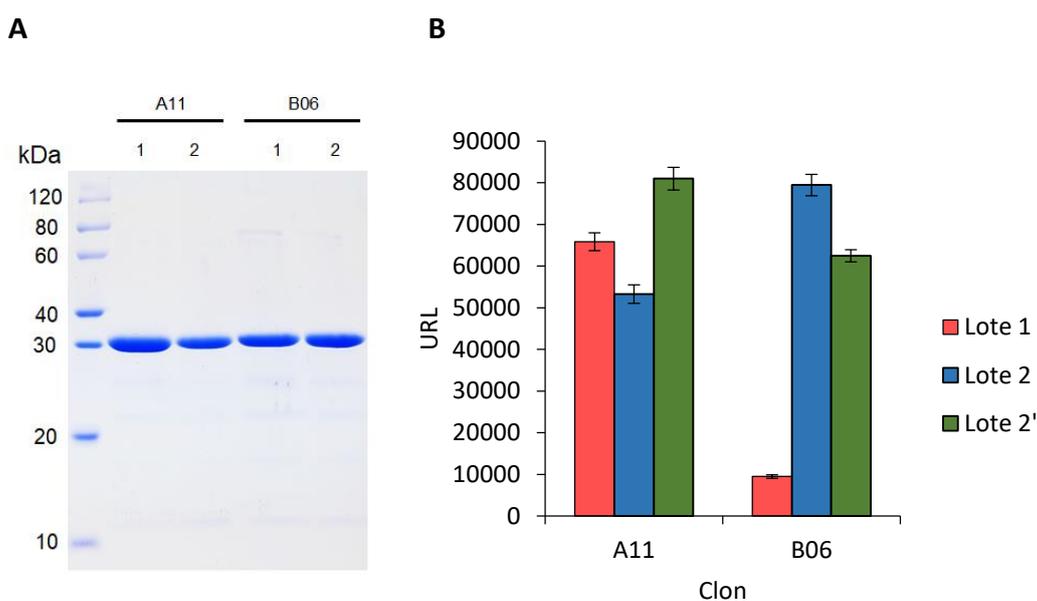


Figura 53 | Evaluación de una nueva producción de quimeras anti-IgE Nb-NanoLuc. (A) Electroforesis SDS-PAGE de las quimeras purificadas. Los carriles 1 y 2 indican cada una de las producciones realizadas en paralelo. (B) Comparación de la actividad específica de las quimeras entre diferentes lotes. Lote 2 y Lote 2' refieren a las dos producciones realizadas en paralelo. Las medidas de actividad fueron realizadas con 1 ng de enzima por pocillo. Se grafica el promedio de triplicados y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Ante este resultado, se procedió a realizar una nueva producción de los clones restantes (B10, C11, E08 y F12), en iguales condiciones a las producciones anteriores, realizando los cultivos y procesamiento en paralelo, y las purificaciones en forma consecutiva en una misma columna de Ni-NTA (figura 54A). Contando con un nuevo lote de cada uno de los clones, se evaluó su actividad específica, obteniéndose un resultado más uniforme entre ellos que para las producciones anteriores (figura 54B). En este caso, si bien aún se observan diferencias entre clones, el clon que produjo la mayor señal para 1 ng de quimera (NbC11-NanoLuc) presentó una intensidad de luminiscencia 2 veces mayor al clon que presentó la menor señal (NbB10-NanoLuc). Teniendo en cuenta este resultado, resulta claro que existe algún aspecto variable dentro del proceso de producción y purificación que debería ser identificado y controlado. Este

trabajo no pudo ser realizado en el contexto de la presente tesis, pero es un aspecto central a indagar en el futuro para continuar trabajando con construcciones que contengan esta enzima.

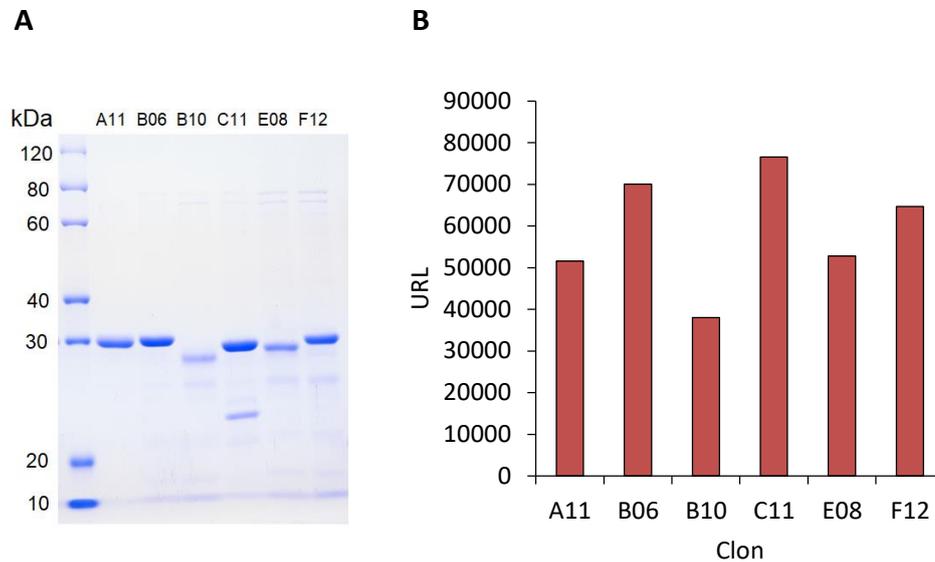


Figura 54 | Evaluación de una nueva producción de clones anti-IgE Nb-NanoLuc. Los clones A11 y B06 fueron producidos en paralelo anteriormente (figura 53A), y los clones B10, C11, E08 y F12 fueron producidos en paralelo entre sí. (A) Electroforesis SDS-PAGE de las quimeras purificadas. (B) Medidas de actividad específica de las quimeras anti-IgE Nb-NanoLuc. Las medidas fueron realizadas con 1 ng de enzima por pocillo. Se grafica el promedio de duplicados en cada caso.

Utilizando las proteínas obtenidas de esta última producción, se realizó una comparación de la capacidad de las quimeras de detectar IgE en el formato de captura (figura 55). Las curvas obtenidas fueron muy similares para todos los clones. Si bien en esta oportunidad no se procedió a realizar una optimización del ensayo, estas curvas permiten concluir que cualquiera de los pares de clones daría lugar a un ensayo de alta sensibilidad, ya que en estas condiciones los límites de detección calculados son en todos los casos sub-ng/mL (calculados como el promedio de la señal del blanco más tres veces el valor de la desviación estándar). En la figura, se incluye además una curva revelada con el primer lote de NbB06-NanoLuc producido, evidenciando que en este caso la baja actividad específica afecta la detección de IgE.

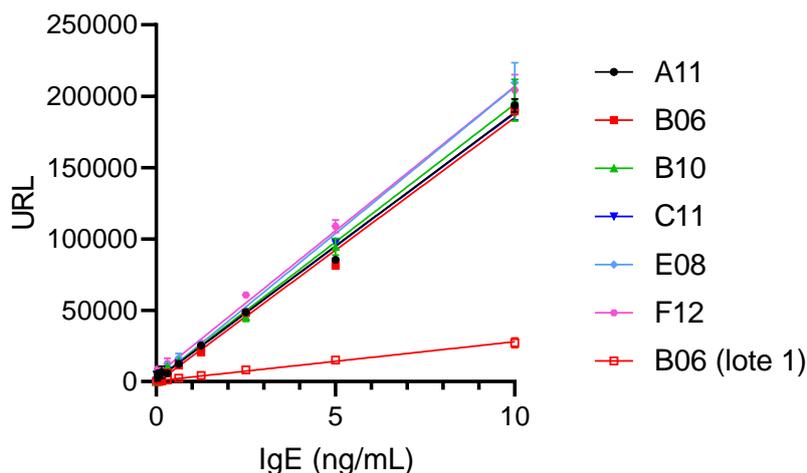
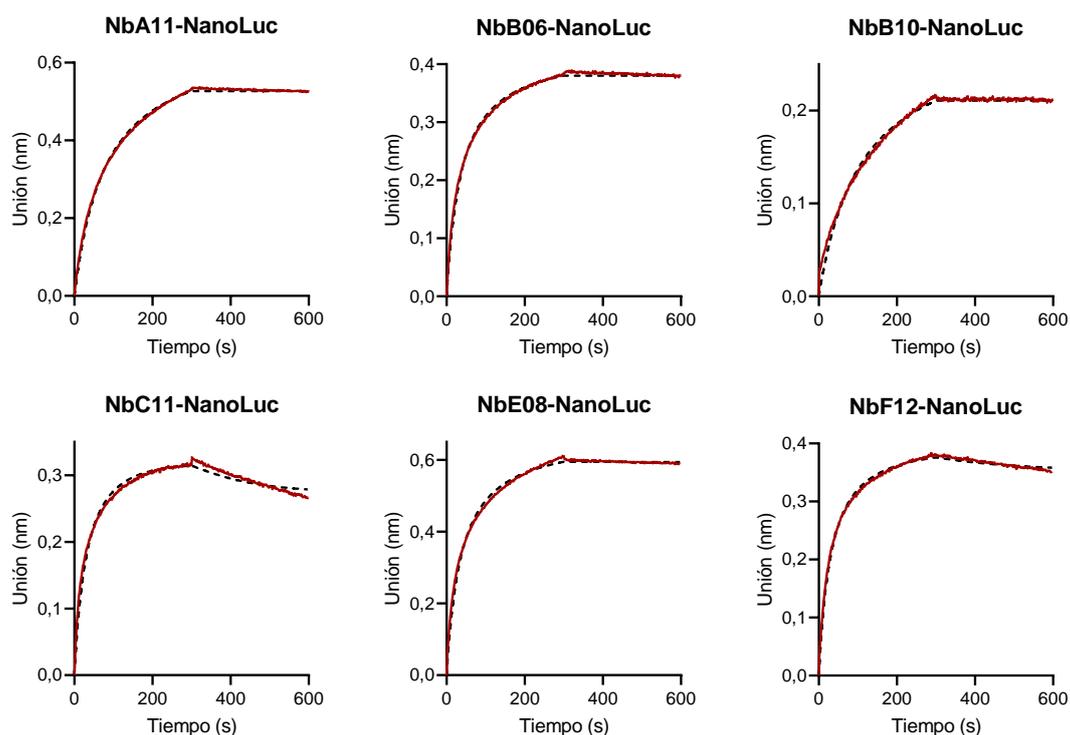


Figura 55 | Curvas de titulación de IgE humana utilizando distintas quimeras Nb-NanoLuc. Se analizaron diluciones seriadas del antígeno, se grafica el promedio de triplicados y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Se incluye un lote anterior de NbB06-NanoLuc, cuya actividad específica era menor.

La similaridad entre las curvas obtenidas resulta algo llamativo. Esto podría explicarse por distintos factores. En primer lugar, dado que el panning y screening fueron llevados a cabo utilizando un formato de captura, era esperable que la mayoría de los clones constituyeran buenos pares para este formato de detección. Adicionalmente, se consideró la posibilidad de que esto se debiera a que los clones presenten afinidades similares. Para explorar este último punto, se realizaron medidas aproximadas de afinidad mediante interferometría de biocapa, evaluando la unión de 400 nM de cada una de las quimeras al antígeno inmovilizado (**figura 56**). Los clones A11, B06, B10 y E08 presentaron una muy alta afinidad, menor o igual a 0,1 nM, mientras que C11 y F12 presentaron constantes de afinidad algo mayores (9,28 y 3,45 nM respectivamente), tratándose de todas formas de clones de muy alta afinidad por su antígeno. Si bien existen diferencias de afinidad entre los clones, es posible que las mismas no se traduzcan en diferencias de sensibilidad debido a que la afinidad es alta en todos los casos y las quimeras se encuentran en exceso en las condiciones del ensayo.

A**B**

Clon	K_D (M)
A11	$< 1 \times 10^{-10}$
B06	$< 1 \times 10^{-10}$
B10	$< 1 \times 10^{-10}$
C11	$9,28 \times 10^{-9}$
E08	$1,01 \times 10^{-10}$
F12	$3,45 \times 10^{-9}$

Figura 56 | Medidas aproximadas de afinidad de los nanobodies anti-IgE seleccionados. (A) Sensogramas de interferometría de biocapa obtenidos para la asociación y disociación de cada clon, realizados a una concentración de 400 nM de cada quimera sobre sensores amino-reactivos donde la IgE fue inmovilizada covalentemente. Los datos fueron ajustados a un modelo de unión 1:1 (línea punteada). **(B)** Constantes de equilibrio de disociación estimadas.

La nueva estrategia de panning para el aislamiento de pares de nanobodies y posterior selección de clones en formato high-throughput permitió la selección de varios pares de nanobodies de alta afinidad contra el antígeno de interés, generando además reactivos de detección prontos para usar con capacidad reportera intrínseca. En este sentido, la estrategia tiene un enorme potencial. El proceso también permitió identificar algunos puntos débiles a

mejorar. En efecto, al expresar a gran escala diferentes nanobodies fusionados a NanoLuc se verificaron diferencias importantes en la actividad enzimática específica, cuya causa, si bien no estaría relacionada con la secuencia del nanobody, no pudo ser identificada. Este resultado fue inesperado dado que NanoLuc se destaca por su alta estabilidad, habiéndose reportado que preserva su actividad ante factores como temperaturas elevadas y agentes desnaturalizantes[28]. Si bien estas diferencias podrían estar presentes en los extractos utilizados en el screening, dado que estos son generados simultáneamente en idénticas condiciones en bloques de cultivo de 96 pocillos, es de esperar que estas diferencias sean mínimas y no comprometan la validez del método. De todas formas, en el futuro será necesario identificar la causa y poder controlar la pérdida de actividad enzimática observada, tanto para mejorar la eficiencia del uso de las quimeras durante la selección, como para su producción como reactivo final de inmunoensayos.

En relación a la capacidad del método de screening de discriminar entre clones de alta y baja afinidad, es difícil sacar conclusiones dado que todos los clones obtenidos presentaron afinidades similares. Respecto a este punto, es importante destacar que durante la inmunización de la llama que condujo a la construcción de esta biblioteca se observó un fuerte efecto *booster*, de una magnitud que generalmente no se observa con los protocolos convencionales de inmunización. Muy probablemente, esta sea la causa de la elevada afinidad de los clones obtenidos, en contraste con las afinidades típicas de clones aislados de bibliotecas generadas con protocolos convencionales de inmunización, donde no es frecuente que la afinidad de los nanobodies seleccionados sea sub-nanomolar. De hecho, en un análisis realizado por Zavrtnik *et al* de constantes de afinidad de nanobodies que han sido publicadas se reportó que el valor promedio es de 6 nM[55]. Por este motivo, la biblioteca inmune generada constituyó un modelo poco desafiante y por tanto subóptimo para el desarrollo de este nuevo método de screening. Es posible que la utilización de otras bibliotecas cuyos clones sean más diversos en términos de su afinidad permita una mejor evaluación de este método. Por otra parte, puede concluirse que el esquema de inmunización utilizado para la construcción de esta biblioteca podría ser una estrategia valiosa para otras aplicaciones, en casos donde la obtención de nanobodies de alta afinidad sea una prioridad.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta tesis se exploró la incorporación de la luciferasa NanoLuc como enzima reportera en inmunodiagnóstico, generando quimeras con nanobodies. Inicialmente utilizando como modelo una quimera con un nanobody anti-microcistina (NbA2-NanoLuc), la misma pudo ser expresada en *E. coli*, y tanto el nanobody como la enzima demostraron ser funcionales. Se demostró además el potencial de la quimera para la detección de microcistina en un formato de competencia, un ensayo que posteriormente fue optimizado por otros integrantes del grupo y demostró una gran mejora en su sensibilidad con respecto a la versión colorimétrica. Esta exploración inicial y el trabajo que le siguió durante esta tesis introdujeron al grupo de trabajo un formato luminiscente alternativo para el revelado de inmunoensayos, incorporando además un sustrato de bajo costo que volvió accesible para el laboratorio el uso de esta enzima.

En base a estos resultados preliminares y en el contexto de la pandemia de COVID-19, la capacidad reportera de NanoLuc se utilizó para desarrollar un ensayo de detección de antígeno para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2. La introducción de esta quimera permitió reducir el tiempo del ensayo, ya que permite prescindir del anticuerpo secundario, además de disminuir a la mitad el límite de detección con respecto al ensayo colorimétrico. El ensayo demostró ser aplicable para la detección del antígeno en muestras de hisopado nasofaríngeo, en este caso, el uso de NanoLuc aumentó en forma considerable la sensibilidad diagnóstica. Además, el ensayo permitió detectar en forma similar tanto la proteína N de la variante ancestral como la de la variante Omicron, el linaje dominante en la actualidad. Cabe destacar que en el ensayo luminiscente desarrollado todos los reactivos pueden ser producidos en forma recombinante, por lo cual el mismo podría ser reproducido fácilmente por otros laboratorios. Estos resultados fueron reflejados en la publicación "*A highly sensitive nanobody-based immunoassay detecting SARS-CoV-2 nucleocapsid protein using all-recombinant reagents*", adjunta al final de la tesis, donde se hacen públicas las secuencias de todas las construcciones generadas. Utilizando estos nanobodies, sería posible además adaptar el ensayo a otros formatos, como por ejemplo inmunoensayos de flujo lateral con lecturas colorimétricas o luminiscentes.

A continuación, se exploró una estrategia alternativa de selección de pares de nanobodies para inmunoensayos de captura, utilizando como antígeno modelo la IgE humana. En este caso, a diferencia de la estrategia utilizada para la selección de nanobodies anti-proteína N, se seleccionó en primer lugar un nanobody de captura, y el inmunocomplejo formado por este nanobody y la IgE fue utilizado como molécula selectora en el panning. En esta estrategia, el pool de partida para la selección de nanobodies de detección no se limita a los clones seleccionados en una primera instancia de panning, sino que se recurre a la diversidad total de la biblioteca original, promoviendo la selección empírica de los mejores nanobodies de detección. Como ventaja adicional, de esta forma se bloqueó durante el panning el epítipo del nanobody de captura, que en este caso era un clon dominante y pudo ser excluido.

Finalmente, se trabajó además en el desarrollo de un método de screening basado en la generación de quimeras nanobody-NanoLuc. Sin embargo, la capacidad del mismo para discriminar clones relevantes no pudo ser apropiadamente validada, principalmente debido a que la biblioteca presentaba una sobre-representación de clones de muy alta afinidad. De todas formas, se pudo evidenciar el potencial del método, a partir del cual se seleccionaron seis clones de muy alta afinidad contra el antígeno de interés. Otro aspecto de gran importancia es que el método permite determinar fácilmente el nivel de expresión de los nanobodies, mediante la determinación de la actividad de NanoLuc en extractos de cultivo. Esto puede funcionar como un criterio inicial de selección muy útil a la hora de aislar clones de interés a partir de cualquier biblioteca.

Otro aprendizaje de esta tesis fue la observación de que, durante la expresión a mayor escala de quimeras anti-IgE, inicialmente se encontraron diferencias importantes en la actividad específica de diferentes producciones. Estas diferencias pudieron ser en gran medida corregidas mediante la realización de una nueva producción de todos los clones en paralelo. Sin embargo, la identificación de esta fuente de variabilidad es un aspecto a explorar en el futuro. Asimismo, otra perspectiva es la validación de este método de screening utilizando una biblioteca cuyos clones presenten una más amplia distribución de afinidades.

El trabajo en esta tesis con quimeras nanobody-NanoLuc incorporó al laboratorio una nueva herramienta con diversas posibles aplicaciones. Una importante perspectiva es la exploración de otros sistemas derivados de esta enzima, como el sistema NanoBiT, basado en la complementación de fragmentos inactivos de NanoLuc que al ser aproximados en el espacio mediante su fusión, por ejemplo, a nanobodies contra un mismo antígeno, pueden asociarse para reconstituir la actividad enzimática. De esta forma, permiten el desarrollo de inmunoensayos rápidos en una única fase, denominados de “mezcla-y-lectura”. Esta es una posibilidad que ya ha comenzado a explorarse, con resultados muy prometedores.

REFERENCIAS

1. Berson, S.A. and R.S. Yalow, *Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody*. J. Clin. Invest., 1959. **38**(11): p. 1996-2016.
2. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-874.
3. Köhler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-497.
4. *ELISA: Methods and Protocols*. 2015 ed. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), ed. R. Hnasko. 2014, New York, NY: Humana Press.
5. Arya, S.K. and P. Estrela, *Recent advances in enhancement strategies for electrochemical ELISA-based immunoassays for cancer biomarker detection*. Sensors (Basel), 2018. **18**(7).
6. Sano, T., C.L. Smith, and C.R. Cantor, *Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates*. Science, 1992. **258**(5079): p. 120-122.
7. Chen, Q., et al., *CRISPR/Cas13a signal amplification linked immunosorbent assay for femtomolar protein detection*. Anal. Chem., 2020. **92**(1): p. 573-577.
8. Krasitskaya, V.V., E.E. Bashmakova, and L.A. Frank, *Coelenterazine-dependent luciferases as a powerful analytical tool for research and biomedical applications*. Int. J. Mol. Sci., 2020. **21**(20).
9. Smirnova, D.V. and N.N. Ugarova, *Firefly Luciferase-based fusion proteins and their applications in bioanalysis*. Photochem. Photobiol., 2017. **93**(2): p. 436-447.
10. Love, A.C. and J.A. Prescher, *Seeing (and using) the light: Recent developments in bioluminescence technology*. Cell Chem. Biol., 2020. **27**(8): p. 904-920.
11. Lloyd, J.E., *Bioluminescence and communication in insects*. Annu. Rev. Entomol., 1983. **28**(1): p. 131-160.
12. Kaskova, Z.M., A.S. Tsarkova, and I.V. Yampolsky, *1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine*. Chem. Soc. Rev., 2016. **45**(21): p. 6048-6077.
13. Inouye, S. and S. Sasaki, *Overexpression, purification and characterization of the catalytic component of Oplophorus luciferase in the deep-sea shrimp, Oplophorus gracilirostris*. Protein Expr. Purif., 2007. **56**(2): p. 261-268.
14. Markova, S.V., M.D. Larionova, and E.S. Vysotski, *Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: Current knowledge and applications*. Photochem. Photobiol., 2019. **95**(3): p. 705-721.
15. Haddock, S.H.D., M.A. Moline, and J.F. Case, *Bioluminescence in the sea*. Ann. Rev. Mar. Sci., 2010. **2**(1): p. 443-493.
16. England, C.G., E.B. Ehlerding, and W. Cai, *NanoLuc: A small Luciferase is brightening up the field of bioluminescence*. Bioconjug. Chem., 2016. **27**(5): p. 1175-1187.
17. de Wet, J.R., et al., *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells*. Mol. Cell. Biol., 1987. **7**(2): p. 725-737.
18. Oyama, H., et al., *Gaussia Luciferase as a genetic fusion partner with antibody fragments for sensitive immunoassay monitoring of clinical biomarkers*. Anal. Chem., 2015. **87**(24): p. 12387-12395.
19. Thorne, N., J. Inglese, and D.S. Auld, *Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology*. Chem. Biol., 2010. **17**(6): p. 646-657.

20. Roda, A., et al., *Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging*. Trends Analyt. Chem., 2009. **28**(3): p. 307-322.
21. Tianyu, J., D. Lupei, and L. Minyong, *Lighting up bioluminescence with coelenterazine: strategies and applications*. Photochem. Photobiol. Sci., 2016. **15**(4): p. 466-480.
22. Tannous, B.A., et al., *Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo*. Mol. Ther., 2005. **11**(3): p. 435-443.
23. Endo, M. and T. Ozawa, *Advanced bioluminescence system for in vivo imaging with brighter and red-shifted light emission*. Int. J. Mol. Sci., 2020. **21**(18): p. 6538.
24. Loening, A.M., et al., *Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output*. Protein Eng. Des. Sel., 2006. **19**(9): p. 391-400.
25. Loening, A.M., A.M. Wu, and S.S. Gambhir, *Red-shifted Renilla reniformis luciferase variants for imaging in living subjects*. Nat. Methods, 2007. **4**(8): p. 641-643.
26. Maguire, C.A., et al., *Gaussia luciferase variant for high-throughput functional screening applications*. Anal. Chem., 2009. **81**(16): p. 7102-7106.
27. Inouye, S., et al., *Secretional luciferase of the luminous shrimp Oplophorus gracilirostris: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase*. FEBS Lett., 2000. **481**(1): p. 19-25.
28. Hall, M.P., et al., *Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate*. ACS Chem. Biol., 2012. **7**(11): p. 1848-1857.
29. Nath, N., et al., *Development of NanoLuc bridging immunoassay for detection of anti-drug antibodies*. J. Immunol. Methods, 2017. **450**: p. 17-26.
30. Ren, W., et al., *One-step ultrasensitive bioluminescent enzyme immunoassay based on nanobody/nanoluciferase fusion for detection of aflatoxin B1 in cereal*. J. Agric. Food Chem., 2019. **67**(18): p. 5221-5229.
31. Oyama, H., et al., *NanoLuc luciferase as a suitable fusion partner of recombinant antibody fragments for developing sensitive luminescent immunoassays*. Anal. Chim. Acta, 2021. **1161**(238180): p. 238180.
32. He, Q., et al., *Generation of bioluminescent enzyme immunoassay for ferritin by single-chain variable fragment and its NanoLuc luciferase fusion*. Anal. Bioanal. Chem., 2022. **414**(23): p. 6939-6946.
33. Hamers-Casterman, C., et al., *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*. Nature, 1993. **363**(6428): p. 446-448.
34. De Simone, E.A., et al., *Development of ELISAs for the measurement of IgM and IgG subclasses in sera from llamas (Lama glama) and assessment of the humoral immune response against different antigens*. Vet. Immunol. Immunopathol., 2008. **126**(1-2): p. 64-73.
35. Muyldermans, S., *Nanobodies: natural single-domain antibodies*. Annu. Rev. Biochem., 2013. **82**(1): p. 775-797.
36. Conca, W., et al., *The immunoglobulin A isotype of the Arabian camel (Camelus dromedarius) preserves the dualistic structure of unconventional single-domain and canonical heavy chains*. Front. Immunol., 2023. **14**.
37. Achour, I., et al., *Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus*. J. Immunol., 2008. **181**(3): p. 2001-2009.
38. Ming, L., et al., *Chromosome-level assembly of wild Bactrian camel genome reveals organization of immune gene loci*. Mol. Ecol. Resour., 2020. **20**(3): p. 770-780.
39. Nguyen, V.K., et al., *Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies*. Mol. Immunol., 1999. **36**(8): p. 515-524.
40. Vu, K.B., et al., *Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies*. Mol. Immunol., 1997. **34**(16-17): p. 1121-1131.

41. Muyldermans, S., et al., *Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains*. Protein Eng., 1994. **7**(9): p. 1129-1135.
42. Harmsen, M.M., et al., *Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features*. Mol. Immunol., 2000. **37**(10): p. 579-590.
43. Decanniere, K., et al., *A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops*. Structure, 1999. **7**(4): p. 361-370.
44. Spinelli, S., et al., *The crystal structure of a llama heavy chain variable domain*. Nat. Struct. Biol., 1996. **3**(9): p. 752-757.
45. Chothia, C., et al., *Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains*. J. Mol. Biol., 1985. **186**(3): p. 651-663.
46. Nguyen, V.K., et al., *Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire*. EMBO J., 2000. **19**(5): p. 921-930.
47. De Genst, E., et al., *Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2006. **103**(12): p. 4586-4591.
48. Gordon, G.L., et al., *A comparison of the binding sites of antibodies and single-domain antibodies*. Front. Immunol., 2023. **14**: p. 1231623.
49. Flajnik, M.F., N. Deschacht, and S. Muyldermans, *A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels?* PLoS Biol., 2011. **9**(8): p. e1001120.
50. Deschacht, N., et al., *A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire*. J. Immunol., 2010. **184**(10): p. 5696-5704.
51. Li, X., et al., *Comparative analysis of immune repertoires between Bactrian camel's conventional and heavy-chain antibodies*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0161801.
52. Greenberg, A.S., et al., *A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 168-173.
53. Nguyen, V.K., et al., *Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation*. Immunogenetics, 2002. **54**(1): p. 39-47.
54. Mitchell, L.S. and L.J. Colwell, *Comparative analysis of nanobody sequence and structure data*. Proteins, 2018. **86**(7): p. 697-706.
55. Zavrtnik, U., et al., *Structural basis of epitope recognition by heavy-chain camelid antibodies*. J. Mol. Biol., 2018. **430**(21): p. 4369-4386.
56. van der Linden, R.H., et al., *Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies*. Biochim. Biophys. Acta, 1999. **1431**(1): p. 37-46.
57. Hultberg, A., et al., *Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e17665.
58. Skottrup, P.D., et al., *Diagnostic evaluation of a nanobody with picomolar affinity toward the protease RgpB from Porphyromonas gingivalis*. Anal. Biochem., 2011. **415**(2): p. 158-167.
59. Arbabi Ghahroudi, M., et al., *Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies*. FEBS Lett., 1997. **414**(3): p. 521-526.
60. Rothbauer, U., et al., *Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies*. Nat. Methods, 2006. **3**(11): p. 887-889.
61. Tereshko, V., et al., *Toward chaperone-assisted crystallography: protein engineering enhancement of crystal packing and X-ray phasing capabilities of a camelid single-domain antibody (VHH) scaffold*. Protein Sci., 2008. **17**(7): p. 1175-1187.

62. Vaneycken, I., et al., *Immuno-imaging using nanobodies*. Curr. Opin. Biotechnol., 2011. **22**(6): p. 877-881.
63. Li, M., et al., *Uniform orientation of biotinylated nanobody as an affinity binder for detection of Bacillus thuringiensis (Bt) Cry1Ac toxin*. Toxins (Basel), 2014. **6**(12): p. 3208-3222.
64. Ladenson, R.C., et al., *Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment*. Anal. Chem., 2006. **78**(13): p. 4501-4508.
65. Doña, V., et al., *Single domain antibodies are specially suited for quantitative determination of gliadins under denaturing conditions*. J. Agric. Food Chem., 2010. **58**(2): p. 918-926.
66. He, T., et al., *Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol*. Anal. Chem., 2014. **86**(17): p. 8873-8880.
67. Pillay, T.S. and S. Muyldermans, *Application of single-domain antibodies ("nanobodies") to laboratory diagnosis*. Ann. Lab. Med., 2021. **41**(6): p. 549-558.
68. Saerens, D., G.H. Ghassabeh, and S. Muyldermans, *Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics*. Curr. Opin. Pharmacol., 2008. **8**(5): p. 600-608.
69. Muyldermans, S., *Applications of Nanobodies*. Annu. Rev. Anim. Biosci., 2021. **9**(1): p. 401-421.
70. Su, Q., et al., *Recent advances of nanobody applications in diagnosis and detection*. MedComm - Biomaterials and Applications, 2023. **2**(3).
71. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, 1985. **228**(4705): p. 1315-1317.
72. McCafferty, J., et al., *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*. Nature, 1990. **348**(6301): p. 552-554.
73. Gai, S.A. and K.D. Wittrup, *Yeast surface display for protein engineering and characterization*. Curr. Opin. Struct. Biol., 2007. **17**(4): p. 467-473.
74. Francisco, J.A., et al., *Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1993. **90**(22): p. 10444-10448.
75. Beerli, R.R., et al., *Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2008. **105**(38): p. 14336-14341.
76. Valldorf, B., et al., *Antibody display technologies: selecting the cream of the crop*. Biol. Chem., 2022. **403**(5-6): p. 455-477.
77. Hanes, J. and A. Plückthun, *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1997. **94**(10): p. 4937-4942.
78. Roberts, R.W. and J.W. Szostak, *RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1997. **94**(23): p. 12297-12302.
79. Yamaguchi, J., et al., *cDNA display: a novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions*. Nucleic Acids Res., 2009. **37**(16): p. e108.
80. Gonzalez-Sapienza, G., M.A. Rossotti, and S. Tabares-da Rosa, *Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications*. Front. Immunol., 2017. **8**: p. 977.
81. Ledsgaard, L., et al., *Basics of antibody phage display technology*. Toxins (Basel), 2018. **10**(6).
82. Nemudraya, A.A., V.A. Richter, and E.V. Kuligina, *Phage peptide libraries as a source of targeted ligands*. Acta Naturae, 2016. **8**(1): p. 48-57.
83. Hemminga, M.A., et al., *Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages*. Eur. Biophys. J., 2010. **39**(4): p. 541-550.
84. Barbas III, C.F., et al., *Phage Display: A Laboratory Manual*. 2001, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

85. Corman, V.M., et al., *Hosts and sources of endemic human coronaviruses*. Adv. Virus Res., 2018. **100**: p. 163-188.
86. Drosten, C., et al., *Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome*. N. Engl. J. Med., 2003. **348**(20): p. 1967-1976.
87. Cheng, V.C.C., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection*. Clin. Microbiol. Rev., 2007. **20**(4): p. 660-694.
88. Zaki, A.M., et al., *Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia*. N. Engl. J. Med., 2012. **367**(19): p. 1814-1820.
89. World Health Organization. *MERS situation update, December 2023* [Accessed February 10th, 2024]. 2023; Available from: www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html.
90. Mohd, H.A., J.A. Al-Tawfiq, and Z.A. Memish, *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir*. Virol. J., 2016. **13**(1): p. 87.
91. Lu, R., et al., *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding*. Lancet, 2020. **395**(10224): p. 565-574.
92. World Health Organization. *COVID-19 epidemiological update – 22 December 2023* [Accessed February 10th, 2024]. 2023; Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update---22-december-2023>.
93. Fehr, A.R. and S. Perlman, *Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis*. Methods Mol. Biol., 2015. **1282**: p. 1-23.
94. Lamers, M.M. and B.L. Haagmans, *SARS-CoV-2 pathogenesis*. Nat. Rev. Microbiol., 2022. **20**(5): p. 270-284.
95. Huang, Y., et al., *Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19*. Acta Pharmacol. Sin., 2020. **41**(9): p. 1141-1149.
96. Vilar, S. and D.G. Isom, *One year of SARS-CoV-2: How much has the virus changed?* Biology (Basel), 2021. **10**(2): p. 91.
97. Cong, Y., et al., *Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle*. J. Virol., 2020. **94**(4).
98. Schelle, B., et al., *Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein*. J. Virol., 2005. **79**(11): p. 6620-6630.
99. Surjit, M. and S.K. Lal, *The SARS-CoV nucleocapsid protein: a protein with multifarious activities*. Infect. Genet. Evol., 2008. **8**(4): p. 397-405.
100. Cubuk, J., et al., *The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA*. Nat. Commun., 2021. **12**(1): p. 1936.
101. Hajnik, R.L., et al., *Dual spike and nucleocapsid mRNA vaccination confer protection against SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants in preclinical models*. Sci. Transl. Med., 2022. **14**(662): p. eabq1945.
102. Dutta, N.K., K. Mazumdar, and J.T. Gordy, *The nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: A target for vaccine development*. J. Virol., 2020. **94**(13).
103. Ye, Q., S. Lu, and K.D. Corbett, *Structural basis for SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein recognition by single-domain antibodies*. Front. Immunol., 2021. **12**: p. 719037.
104. Rota, P.A., et al., *Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome*. Science, 2003. **300**(5624): p. 1394-1399.
105. Yu, F., 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. Diagn. Lab. Immunol., 2005. **12**(7): p. 848-854.

106. Yamaoka, Y., et al., *Highly specific monoclonal antibodies and epitope identification against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein for antigen detection tests*. Cell Rep. Med., 2021. **2**(6): p. 100311.
107. Carabelli, A.M., et al., *SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness*. Nat. Rev. Microbiol., 2023. **21**(3): p. 162-177.
108. Roemer, C., et al., *SARS-CoV-2 evolution in the Omicron era*. Nat. Microbiol., 2023. **8**(11): p. 1952-1959.
109. Hacisuleyman, E., et al., *Vaccine breakthrough infections with SARS-CoV-2 variants*. N. Engl. J. Med., 2021. **384**(23): p. 2212-2218.
110. Tuekprakhon, A., et al., *Antibody escape of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 from vaccine and BA.1 serum*. Cell, 2022. **185**(14): p. 2422-2433.e13.
111. Aranha, C., et al., *Cycle threshold values in RT-PCR to determine dynamics of SARS-CoV-2 viral load: An approach to reduce the isolation period for COVID-19 patients*. J. Med. Virol., 2021. **93**(12): p. 6794-6797.
112. Behera, B.C., R.R. Mishra, and H. Thatoi, *Recent biotechnological tools for diagnosis of corona virus disease: A review*. Biotechnol. Prog., 2021. **37**(1): p. e3078.
113. Chu, V.T., et al., *Comparison of home antigen testing with RT-PCR and viral culture during the course of SARS-CoV-2 infection*. JAMA Intern. Med., 2022. **182**(7): p. 701-709.
114. Schuit, E., et al., *Diagnostic accuracy of rapid antigen tests in asymptomatic and presymptomatic close contacts of individuals with confirmed SARS-CoV-2 infection: cross sectional study*. BMJ, 2021. **374**: p. n1676.
115. Polechová, J., et al., *SARS-CoV-2 rapid antigen tests provide benefits for epidemic control - observations from Austrian schools*. J. Clin. Epidemiol., 2022. **145**: p. 14-19.
116. Leung, D.T.M., et al., *Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid*. J. Infect. Dis., 2004. **190**(2): p. 379-386.
117. Bar-On, Y.M., et al., *SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers*. Elife, 2020. **9**.
118. Barlev-Gross, M., et al., *Spike vs nucleocapsid SARS-CoV-2 antigen detection: application in nasopharyngeal swab specimens*. Anal. Bioanal. Chem., 2021. **413**(13): p. 3501-3510.
119. Isaacs, A., et al., *Nucleocapsid specific diagnostics for the detection of divergent SARS-CoV-2 variants*. Front. Immunol., 2022. **13**: p. 926262.
120. Lu, R.-M., et al., *Monoclonal antibodies against nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 variants for detection of COVID-19*. Int. J. Mol. Sci., 2021. **22**(22): p. 12412.
121. Chung, D., et al., *The significance of serum total immunoglobulin E for in vitro diagnosis of allergic rhinitis*. Int. Forum Allergy Rhinol., 2014. **4**(1): p. 56-60.
122. Hu, Y., et al., *Clinical relevance of eosinophils, basophils, serum total IgE level, allergen-specific IgE, and clinical features in atopic dermatitis*. J. Clin. Lab. Anal., 2020. **34**(6): p. e23214.
123. Kaplan, A.P., A.M. Giménez-Arnau, and S.S. Saini, *Mechanisms of action that contribute to efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria*. Allergy, 2017. **72**(4): p. 519-533.
124. Ertas, R., et al., *The clinical response to omalizumab in chronic spontaneous urticaria patients is linked to and predicted by IgE levels and their change*. Allergy, 2018. **73**(3): p. 705-712.
125. Proczek, G., et al., *Total serum IgE quantification by microfluidic ELISA using magnetic beads*. Anal. Bioanal. Chem., 2012. **402**(8): p. 2645-2653.
126. Murphy, K., C. Weaver, and C. Janeway, *Janeway's immunobiology*. 9th edition ed. 2017, New York: Garland Science.
127. Mothes, N., R. Valenta, and S. Spitzauer, *Allergy testing: the role of recombinant allergens*. Clin. Chem. Lab. Med., 2006. **44**(2): p. 125-132.

128. Ansotegui, I.J., et al., *IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper*. World Allergy Organ. J., 2020. **13**(2): p. 100080.
129. Canonica, G.W., et al., *A WAO - ARIA - GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics*. World Allergy Organ. J., 2013. **6**(1): p. 17.
130. Van Gasse, A.L., et al., *Molecular allergy diagnosis: status anno 2015*. Clin. Chim. Acta, 2015. **444**: p. 54-61.
131. Barbas, C.F., 3rd, et al., *Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1991. **88**(18): p. 7978-7982.
132. Tabares-da Rosa, S., et al., *Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity anti-hapten antibodies that are not favored in the llama immune response*. Anal. Chem., 2011. **83**(18): p. 7213-7220.
133. Rossotti, M., et al., *Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells*. Biochim. Biophys. Acta, 2015. **1850**(7): p. 1397-1404.
134. Olichon, A., et al., *Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains*. BMC Biotechnol., 2007. **7**(1): p. 7.
135. Carlomagno, M., et al., *Recombinant streptavidin nanopeptamer anti-immunocomplex assay for noncompetitive detection of small analytes*. Anal. Chem., 2014. **86**(20): p. 10467-10473.
136. Welch, S.R., et al., *Analysis of inactivation of SARS-CoV-2 by specimen transport media, nucleic acid extraction reagents, detergents, and fixatives*. J. Clin. Microbiol., 2020. **58**(11).
137. Ministerio de Salud Pública. *Informe epidemiológico COVID-19. Actualización al 20 de febrero de 2022*. [Accessed March 1st, 2023]. 2022; Available from: www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/documentos/noticias/Informe%20epidemiológico%2000222.pdf.
138. Pérez-Schirmer, M., et al., *Comparison of three anti-hapten VHH selection strategies for the development of highly sensitive immunoassays for microcystins*. Anal. Chem., 2017. **89**(12): p. 6800-6806.
139. World Health Organization. *Cyanobacterial toxins: microcystins. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments*. 2020, Geneva, Switzerland.
140. Mark, J., et al., *SARS coronavirus: unusual lability of the nucleocapsid protein*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008. **377**(2): p. 429-433.
141. Stocks, B.B., et al., *Production and characterization of a SARS-CoV-2 nucleocapsid protein reference material*. ACS Meas. Sci. Au, 2022. **2**(6): p. 620-628.
142. Mutantu, P.N., et al., *Development and evaluation of quantitative immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Coronavirus disease 2019 using truncated recombinant nucleocapsid protein as assay antigen*. Int. J. Environ. Res. Public Health, 2021. **18**(18): p. 9630.
143. Shukla, E., et al., *Improved stability and manufacturability of nucleocapsid antigens for SARS-CoV2 diagnostics through protein engineering*. Biomolecules, 2023. **13**(10): p. 1524.
144. Lutomski, C.A., et al., *Multiple roles of SARS-CoV-2 N protein facilitated by proteoform-specific interactions with RNA, host proteins, and convalescent antibodies*. JACS Au, 2021. **1**(8): p. 1147-1157.
145. Meyer, B., et al., *Characterising proteolysis during SARS-CoV-2 infection identifies viral cleavage sites and cellular targets with therapeutic potential*. Nat. Commun., 2021. **12**(1): p. 5553.
146. Scarrone, M., et al., *Development of anti-human IgM nanobodies as universal reagents for general immunodiagnosics*. N. Biotechnol., 2021. **64**: p. 9-16.

147. Ding, Y., et al., "Ready-to-use" immunosensor for the detection of small molecules with fast readout. *Biosens. Bioelectron.*, 2022. **201**(113968): p. 113968.
148. Girt, G.C., et al., *The use of nanobodies in a sensitive ELISA test for SARS-CoV-2 Spike 1 protein*. *R. Soc. Open Sci.*, 2021. **8**(9): p. 211016.
149. Ding, Y., D. Apostolidou, and P. Marszalek, *Mechanical stability of a small, highly-luminescent engineered protein NanoLuc*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020. **22**(1): p. 55.
150. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *J. Gen. Virol.*, 1977. **36**(1): p. 59-74.
151. Tan, E., et al., *HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors*. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021. **9**: p. 796991.
152. Dinnes, J., et al., *Rapid, point-of-care antigen tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection*. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2022. **7**(7): p. CD013705.
153. Panbio. *Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device (Nasopharyngeal)* [Accessed February 10th, 2024]. 2021; Available from: www.globalpointofcare.abbott/es/es/product-details/panbio-covid-19-ag-antigen-test.html.
154. SD Biosensor-Roche. *SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test*. 2021.
155. La Scola, B., et al., *Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2020. **39**(6): p. 1059-1061.
156. Kohmer, N., et al., *The comparative clinical performance of four SARS-CoV-2 rapid antigen tests and their correlation to infectivity in vitro*. *J. Clin. Med.*, 2021. **10**(2): p. 328.
157. Kurhade, C., et al., *Low neutralization of SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2, BQ.1.1 and XBB.1 by parental mRNA vaccine or a BA.5 bivalent booster*. *Nat. Med.*, 2023. **29**(2): p. 344-347.
158. Wang, Q., et al., *Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants*. *Cell*, 2023. **186**(2): p. 279-286.e8.
159. Hagag, I.T., et al., *Mutations in SARS-CoV-2 nucleocapsid in variants of concern impair the sensitivity of SARS-CoV-2 detection by rapid antigen tests*. *Front. Virol.*, 2022. **2**.
160. Osterman, A., et al., *Impaired detection of omicron by SARS-CoV-2 rapid antigen tests*. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2022. **211**(2-3): p. 105-117.
161. Hodcroft, E. *CoVariants* [Accessed April 28th, 2023]. 2023; Available from: www.covariants.org/per-variant.
162. *SARS-CoV-2 Variants Overview* [Accessed April 28th, 2023]. 2023; Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/activ.
163. Lee, J.H., et al., *Long-primed germinal centres with enduring affinity maturation and clonal migration*. *Nature*, 2022. **609**(7929): p. 998-1004.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Greg Hussack,
National Research Council Canada (NRC),
Canada

REVIEWED BY

Mehdi Arbabi Ghahroudi,
National Research Council Canada (NRC),
Canada
Dubravka Drabek,
Erasmus Medical Center, Netherlands

*CORRESPONDENCE

Gualberto Gonzalez-Sapienza

✉ ggonzal@fq.edu.uy

Gabriel Lassabe

✉ glassabe@fq.edu.uy

RECEIVED 10 May 2023

ACCEPTED 21 June 2023

PUBLISHED 11 July 2023

CITATION

Segovia-de los Santos P, Padula-Roca C,
Simon X, Echaides C, Lassabe G and
Gonzalez-Sapienza G (2023) A highly
sensitive nanobody-based immunoassay
detecting SARS-CoV-2 nucleocapsid
protein using all-recombinant reagents.
Front. Immunol. 14:1220477.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1220477

COPYRIGHT

© 2023 Segovia-de los Santos, Padula-Roca,
Simon, Echaides, Lassabe and Gonzalez-
Sapienza. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

A highly sensitive nanobody- based immunoassay detecting SARS-CoV-2 nucleocapsid protein using all-recombinant reagents

Paula Segovia-de los Santos¹, Carolina Padula-Roca¹,
Ximena Simon², Cesar Echaides³, Gabriel Lassabe^{1*}
and Gualberto Gonzalez-Sapienza^{1*}

¹Cátedra de Inmunología, Departamento de Biociencias (DEPBIO), Facultad de Química, Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay, ²ATGen SRL, Montevideo, Uruguay, ³Parque Lecocq, Intendencia Municipal de Montevideo (IMM), Montevideo, Uruguay

Antigen tests have been crucial for managing the COVID-19 pandemic by identifying individuals infected with SARS-CoV-2. This remains true even after immunity has been widely attained through natural infection and vaccination, since it only provides moderate protection against transmission and is highly permeable to the emergence of new virus variants. For this reason, the widespread availability of diagnostic methods is essential for health systems to manage outbreaks effectively. In this work, we generated nanobodies to the virus nucleocapsid protein (NP) and after an affinity-guided selection identified a nanobody pair that allowed the detection of NP at sub-ng/mL levels in a colorimetric two-site ELISA, demonstrating high diagnostic value with clinical samples. We further modified the assay by using a nanobody-NanoLuc luciferase chimeric tracer, resulting in increased sensitivity (detection limit = 61 pg/mL) and remarkable improvement in diagnostic performance. The luminescent assay was finally evaluated using 115 nasopharyngeal swab samples. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis revealed a sensitivity of 78.7% (95% confidence interval: 64.3%-89.3%) and specificity of 100.0% (95% confidence interval: 94.7%-100.0%). The test allows the parallel analysis of a large number of untreated samples, and fulfills our goal of producing a recombinant reagent-based test that can be reproduced at low cost by other laboratories with recombinant expression capabilities, aiding to build diagnostic capacity.

KEYWORDS

COVID-19, testing, nanobody, in-house, NanoLuc, nucleocapsid protein, SARS-CoV-2, luminescent ELISA

1 Introduction

The knowledge in late 2019 that a highly infectious novel coronavirus, SARS-CoV-2, had begun circulating in the human population marked the beginning of one of the largest global public health crises that humanity has faced in recent times. Diagnostic methods for detecting acute infection were a critical component in managing and controlling the pandemic. Indeed, timely identification of infected individuals to manage their isolation and avoid transmission was essential in the early days of the pandemic when the population was immunologically naïve to the infection (1), and continues to be so because the immunity generated through natural infection and vaccination, although of enormous value to reduce the impact of severe disease and mortality, has shown a moderate effect in preventing transmission and is particularly permeable to the emergence of new variants of the virus (2, 3).

Viral culture has been proposed as the most reliable way to establish whether an individual is infectious, but the technique is complex, highly specialized, and requires very high levels of biosafety. In addition, different studies have revealed the difficulty in demonstrating the presence of the virus by this technique, which translates into a much lower sensitivity than that achieved by molecular methods of nucleic acid amplification such as the quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) (4, 5). Since the start of the pandemic, the analysis of nasopharyngeal or oro-pharyngeal samples by RT-qPCR became the reference standard diagnostic method, using particular cycle threshold (Ct) values to classify individuals as potentially infected (6, 7). Intrinsic to the method, the detection of viral nucleic acids by RT-qPCR works with a very low false positive rate and is extremely sensitive (8), but its instrumentation requires expensive equipment, costly reagents, and specialized personnel. In addition, it has been shown that Ct values and their correlation with viral load have a significant degree of variation between laboratories, even when the target genes are the same (9, 10).

Although less sensitive than RT-qPCR, assays that detect the presence of viral antigens (antigen tests) are much cheaper, can be portable, require less equipment, and are easy to use with minimal requirements for sample processing. The antigen of choice in most antigen-detection assays is the nucleocapsid protein (NP), a structural protein whose primary function is to package the viral RNA genome to form the nucleocapsid. Additionally, coronaviral NPs have been shown to play regulatory roles, being involved in viral genome replication (11, 12) and in the perturbation of host cellular processes (13). NP is a 46 kDa protein and consists of an N-terminal domain and a C-terminal domain, linked by an intrinsically disordered serine/arginine-rich region (14). Its high expression level (15, 16) allows for the development of more sensitive assays compared to those that target other viral proteins such as Spike (17). Furthermore, because of its lower mutation rate, antibodies against NP are more likely to react with the NP of emerging virus variants (18, 19). These factors make it the most suitable option for antigen detection tests.

NP detection tests have their detection peak four days after the onset of symptoms and their sensitivity increases with a second test after 1 or 2 days in the early stage of infection (5). Its

diagnostic peak largely overlaps with the period of highest viral load and therefore it correlates with the highest period of infectiousness (20). For these reasons, antigen tests began gradually to occupy a very important place in the control of the pandemic, initially as a complementary entry test to RT-qPCR, and later, in many cases, as the frontline method used for the diagnosis of infection and discharge management of patients (21, 22). As a consequence of the global impact of the pandemic, a huge number of commercial antigen tests have been developed, mostly lateral flow immunoassays. Diagnostic parameters vary significantly among tests. A review by the Cochrane group of 20 commercially available tests found that average sensitivities ranged from 34.3% to 91.3% in symptomatic participants, while the specificity was generally high, with 17 of 20 tests meeting the WHO acceptable performance criterion of 97% specificity (23).

During outbreaks, the load of samples to be processed can be overwhelming, which can become a critical bottleneck for patient care and epidemic control. For this reason, the aim of this work was to generate a simple yet sensitive laboratory antigen test that allows the parallel analysis of a high number of untreated samples, based on recombinant reagents that can be produced locally. To achieve this goal, we chose to work with nanobodies (Nbs) as immunodetection elements. Nanobodies are the recombinant form of the variable domain of the heavy chain-only antibodies (HcAbs) found in camelids (family *Camelidae*) and have emerged as highly advantageous diagnostic reagents. They can be produced inexpensively as soluble protein expressed in the *Escherichia coli* periplasm (24), and possess high affinity and outstanding stability (25). Their single-domain nature allows the construction of rich phage display libraries with full preservation of the specificity generated *in vivo*. This is a major advantage over conventional antibody libraries where the random combination of heavy and light chains during library construction makes it difficult to recover the original specificity (25). This comprehensive representation of the immunization-induced immune repertoire allows for the application of different forms of selective pressure throughout panning of the library, thus identifying Nbs with the desired functionality. Taking advantage of this feature, we have previously developed a high-throughput strategy for the selection of nanobody pairs that enable highly sensitive detection of biomarkers by sandwich immunoassays (26). In this work, we generated a Nb phage display library from a llama immunized with the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 and performed a pairwise selection of two nanobodies for the detection of the antigen in nasopharyngeal swabs. To maximize sensitivity, shorten assay time and facilitate the in-house preparation of all reagents, the detection Nb was fused through a flexible linker to NanoLuc, a small (19 kDa) luciferase enzyme derived from the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilirostris* (27). NanoLuc has been engineered to be stable, soluble, highly expressed, and to use affordable substrates, displaying a 150-fold higher specific activity than other available luciferases (27). In our application, the Nb-NanoLuc chimera resulted not only in a reduction in test time, but also in a considerable increase in the diagnostic value of the test compared to the colorimetric detection.

2 Materials and methods

2.1 Materials

D-biotin, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), LB Broth (Miller), trypsin from bovine pancreas, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), Tween 20, polyethylene glycol 8000 (PEG), and other common chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The anti-hemagglutinin epitope (anti-HA) antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) was also from Sigma-Aldrich (Cat No. 12013819001). Antibiotics were from AppliChem (Darmstadt, Germany). Bovine Serum Albumin (BSA) was from Golden West BioSolutions (Temecula, CA, USA). TRIzol reagent and streptavidin were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Lymphocyte Separation Media (density 1.077 g/mL), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Fetal Bovine Serum (FBS) were from Capricorn Scientific (Ebsdorfergrund, Germany). Molecular biology reagents, *E. coli* One Shot BL21(DE3) cells and antibiotic-antimycotic solution for cell culture were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). PEI MAX was from Polysciences (Warrington, PA, USA). *E. coli* ER2738 electrocompetent cells were purchased from Lucigen Corporation (Middleton, WI, USA). Helper phage M13KO7 was purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Plasmid extraction, PCR clean-up and gel extraction kits were purchased from Qiagen (Germantown, MD, USA). ELISA strips and plates and 96-deep-well culture blocks were from Greiner Bio-One (Monroe, NC, USA). SARS-CoV-2 BA.5 nucleocapsid protein was from Acro Biosystems (Newark, DE, USA). Chromatography columns were from Cytiva (Uppsala, Sweden). Bio-Layer Interferometry Amine Reactive Second-Generation (AR2G) biosensors, N-hydroxysuccinimide (NHS), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) (EDC) and ethanolamine solution were from ForteBio Inc. (Menlo Park, CA, USA). Furimazine was from CSNpharm (Arlington Heights, IL, USA). SnapGene software was used for the design of genes and primers (from Insightful Science, available at snapgene.com). Primers and genes were obtained from General Biosystems Inc. (Morrisville, NC, USA).

2.2 Expression and purification of nucleocapsid protein

SARS-CoV-2 full-length nucleocapsid protein (NP) (Genbank, Gene ID: 43740575) and NP Δ 121 (an N-terminal deletion mutant lacking the conserved residues 1-121) were cloned into the pET-28a (+) expression plasmid. NP contained a C-terminal Strep-tag, while NP Δ 121 contained a C-terminal 6xHis tag and AviTag peptide (a target for site-specific biotinylation by *E. coli*'s biotin ligase). Plasmids were electroporated into either *E. coli* BL21(DE3) or *E. coli* BL21(DE3)-pBir cells respectively (pBir cells carry the pCY216 vector for overexpression of *E. coli*'s biotin ligase BirA). Flasks containing 200 mL LB-40 μ g/mL kanamycin (supplemented in the case of *E. coli* BL21(DE3)-pBir cells with 100 μ M biotin, 35 μ M chloramphenicol, and 0.04% arabinose to induce expression of the

biotin ligase) were inoculated with 2 mL of an overnight culture started from a single colony. Expression was induced at OD_{600 nm} = 0.6 with 10 μ M IPTG and cultures were grown overnight at 28°C. The following day, cells were harvested by centrifugation and resuspended in 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF and 10 μ g/mL RNase A, pH 7.5, supplemented with 1 mM EDTA in the case of NP culture. Cells were lysed by sonication. NP Δ 121 cell lysates were supplemented with 1 mM biotin and incubated for 2 hours at 37°C with shaking to allow efficient biotinylation. After obtaining cell lysate supernatants by centrifugation, NP was purified using a StrepTrap XT column, while NP Δ 121 was purified using a Ni-NTA column, in both cases according to the manufacturer's instructions and through the ÄKTA purification system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

2.3 Llama immunization and phage display library construction

A 3-year-old llama (*Lama glama*) from Lecocq Municipal Park Zoo (Montevideo) was immunized by subcutaneous injection with 3 doses of 500 μ g of full-length SARS-CoV-2 NP in incomplete Freund adjuvant (one dose every 15 days). Ten days after the final booster 200 mL of blood were drawn and peripheral blood mononuclear cells were obtained by centrifugation on Lymphocyte Separation Media (density 1.077 g/mL) gradients. Total RNA from 6×10^7 cells was extracted using TRIzol reagent and reverse-transcribed using RevertAID reverse transcriptase and the HcAb hinge-specific primers INQ-H2 (5'-GGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGGTT-3') and INQ-H3 (5'-GAGCTGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3'), which allow the reverse-transcription of the variable domain of HcAbs (mostly VHH domains, occasionally HcAb-associated VH domains) but not of conventional antibodies. cDNA of these variable domain genes was amplified by polymerase chain reaction (PCR) as previously described (28), SfiI-digested, cloned into the pComb3X phagemid vector and electroporated into *E. coli* ER2738 cells. To generate the phage library, transformed cells were cultured and superinfected with helper phage M13KO7. The next day, after harvesting the supernatant by centrifugation, phage particles were obtained by precipitation with 20% polyethylene glycol 8000 as previously described (28).

2.4 Panning for the selection of NP-specific nanobodies

Four wells of a high-binding 8-well strip were coated with 100 μ L/well of 1 μ g/mL full-length NP by overnight incubation at 4°C. After blocking with PBS-1% BSA for 30 minutes at 37°C, wells were incubated with 1×10^{10} colony-forming units of the phage library for 1.5 hours at room temperature (RT). After 10 rounds of washing with PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T), a 30-minute incubation with PBS-T at RT and a further 10 rounds of washing with PBS-T, bound phages were eluted by adding 50 μ L/well of 10 mg/mL trypsin in

TBS buffer and incubating for 30 min at 37°C. The phage output was titrated and amplified in *E. coli* ER2738 for a second round of selection. Two rounds of panning were conducted in this way. For the third round of panning, two strategies were carried out in parallel, the first one as described above (non-competitive strategy), and the second one including a competition step prior to elution, where bound phages were incubated with 100 μ L/well of 50 μ g/mL NP overnight at 4°C. The latter strategy is intended to promote the selection of clones with a slow kinetic dissociation constant (k_{off}), since clones with a faster k_{off} would at some point dissociate from the immobilized antigen and be captured by the excess antigen in solution.

2.5 High-throughput expression of nanobodies and screening

DNA from the final output of the non-competitive panning strategy was amplified by using 50 μ L of phage output to infect 500 μ L of an *E. coli* ER2738 culture ($OD_{600\text{ nm}} = 1.0$), which was then diluted in 9.5 mL of SB broth supplemented with 100 μ g/mL ampicillin and grown overnight at 37°C. Phagemid DNA was isolated using the QIAprep[®] Spin Miniprep Kit, SfiI-digested and gel-purified using the QIAquick[®] Gel Extraction Kit. The purified nanobody genes were cloned into the SfiI-digested pINQ-HAH6 vector (29), which allows the expression of HA- and 6xHis-tagged Nbs. The ligation product was electroporated into *E. coli* BL21(DE3) cells, and 92 individual colonies were cultured in 500 μ L of LB medium containing 40 μ g/mL kanamycin in a 96-deep-well culture block. Nb expression was induced at $OD_{600\text{ nm}} = 0.6$ with 10 μ M IPTG and cultures were incubated overnight at 37°C. The next day, pellets were harvested by centrifugation, resuspended in 200 μ L PBS and lysed by four freeze–thaw cycles followed by 30 min of sonication in a sonicator bath. Cell lysates were centrifuged, and supernatants were later used to test Nb reactivity to NP.

Expression of Nbs from the final output of the slow k_{off} selection strategy was performed by inoculating 2 mL cultures in SB broth with 100 μ g/mL ampicillin with isolated colonies containing the phagemid vector and inducing Nb expression at $OD_{600\text{ nm}} = 0.6$ with 1 mM IPTG overnight at 37°C. In this case, culture media supernatant was used directly for screening. Screening was carried out by ELISA, incubating cell lysates or cell culture supernatants on wells coated with either full-length NP or streptavidin followed by biotinylated NP Δ 121 and blocked with PBS-1% BSA. Bound Nbs were detected using an anti-HA-HRP conjugate.

2.6 Expression and purification of selected nanobodies

Three selected Nb clones were SfiI-digested and cloned into two different vectors for bacterial expression: pINQ-HAH6, which allows the expression of HA- and 6xHis-tagged Nbs, and pINQ-BtH6 (28), which allows the expression of 6xHis-tagged Nbs containing also the AviTag peptide. pINQ-HAH6 clones were electroporated into *E. coli* BL21(DE3) cells, and pINQ-BtH6

clones into *E. coli* BL21(DE3)-pBir cells. Cell cultures and site-specific biotinylation were done as described above for NP and NP Δ 121. Expression was induced at $OD_{600\text{ nm}} = 0.6$ with 1 μ M IPTG and cultures were grown overnight at either 20 or 28°C (conditions were previously optimized for each clone). The following day, cells were harvested by centrifugation, resuspended in PBS or PBS-1 mM biotin and lysed by sonication. Cell lysate supernatants were supplemented with 300 mM NaCl and 20 mM imidazole and Nbs were purified by Ni-NTA columns using the ÄKTA purification system. Finally, Nbs were eluted with 250 mM imidazole, dialyzed against PBS and kept at -20°C until use.

For the expression of the Nb-NanoLuc fusion protein, the ON10 Nb was cloned into the pcDNA3.1(+) vector for transient expression in HEK293T cells. The expression cassette consisted of the Igk leader sequence for protein secretion, the nanobody gene in tandem with NanoLuc luciferase and the Twin-Strep-tag. Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotic-antimycotic, at 37°C and 5% CO₂. Cell cultures at approximately 80% confluence were transfected by using PEI MAX in a 5:1 PEI:DNA mass/weight ratio. Culture media supernatant was harvested by centrifugation 4 days later, and the protein was purified using a StrepTrap XT column according to the manufacturer's instructions.

2.7 K_D determinations and epitope binning by Bio-Layer Interferometry

Binding of Nbs to NP was studied by Bio-Layer interferometry using the BLItz system (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA, USA) and Amine Reactive Second-Generation (AR2G) biosensors. Biosensors activated with N-hydroxysuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) were incubated with 39 μ g/mL NP and then blocked with 1 M ethanolamine, pH 8.5. For K_D determinations, a baseline step was carried out in 400 μ L of 10X kinetic buffer (PBS with 0.2% Tween 20, 1% BSA and 0.05% sodium azide). Nb association was measured on the drop holder for 120 s at concentrations of 10, 25, 50, 100, 200 and 400 nM in 10X kinetic buffer, followed by dissociation in 400 μ L of 10X kinetic buffer for 120 s. All steps were carried out with shaking at 2200 rpm. Data were globally fitted to a 1:1 binding ratio model for calculating the kinetic parameters using Blitz Pro Software, version 1.2 (ForteBio Inc., USA).

For epitope binning, each Nb clone was bound separately at 100 μ g/mL in consecutive 120 s-steps, with shaking at 2200 rpm. As each new clone was bound, all previous clones were included in the solution to counteract the potential displacement of bound Nbs.

2.8 Nanobody sandwich ELISA for the detection of NP

ELISA wells (clear for colorimetric ELISA and white for luminescent ELISA) were coated with 100 μ L of 2 μ g/mL streptavidin diluted in PBS for 1 hour at 37°C and blocked with 200 μ L of 1% casein and 0.05% Tween 20 in carbonate-bicarbonate

buffer pH 9.6 for 30 minutes at 37°C. Biotinylated Nbs were immobilized by incubating 100 μ L of 4 μ g/mL Nbs overnight at 4°C. The next day, wells were incubated for 1 hour at RT with either 100 μ L of serial dilutions of recombinant NP in ATGen's Viral Transport Medium (VTM), generously provided by ATGen, or 100 μ L of nasopharyngeal swab sample in VTM. In colorimetric assays, NP was detected using an HA-tagged Nb followed by an anti-HA-HRP conjugate, each incubated for 1 hour at RT, and finally TMB substrate. Absorbance was read at 450 nm with Fluostar Optima reader (BMG, Ortenberg, Germany). In luminescent assays, wells were incubated with the NbON10-NanoLuc fusion protein for 1 hour at RT, followed by addition of 10 μ M furimazine substrate in PBS containing 1% Triton X-100, 0.25 mg/mL BSA and 8.8 mM EDTA, pH 8.0. This buffer, described by Ren et al (30), allows a good balance of luminescent intensity and signal half-life. The substrate was incubated for 1 minute with shaking and signal was read with Fluostar Optima reader, with an integration time of 0.5 s/well. For both colorimetric and luminescent assays, wells were washed six times with PBS-T after each step.

For each assay, titration curves were constructed using serial dilutions of full-length NP to determine analytical sensitivity. Data was fitted by lineal regression using GraphPad Prism 7 and the limit of detection was defined as the mean absorbance value of the blank plus three standard deviations (31).

2.9 Clinical samples

Nasopharyngeal swabs were collected in VTM and RT-qPCR-tested by ATGen. The samples analyzed in this study were leftover specimens that were anonymized by encoding, so that the identity of the subjects remained anonymous to all persons associated with the research. Triton X-100 was added to a final concentration of 0.5% for viral inactivation (32), and samples were stored at -20°C until their use. In February 2022 n=19 positive and n=10 negative samples were collected, when Omicron (B.1.1.529) had already become the dominating variant in Uruguay, representing nearly 100% of new cases that month (33). A further n=47 positive and n=68 negative samples were collected during March and April 2022, when Omicron B.1.1529 continued to be the dominant variant.

3 Results

3.1 The selection of nanobodies was designed to isolate high affinity clones against both NP and NP Δ 121

A phage display nanobody library of 1×10^7 transformants was constructed from 6×10^7 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a llama that was previously immunized with SARS-CoV-2 full-length nucleocapsid protein (NP) (Genbank, Gene ID: 43740575). Specific nanobodies were selected by performing three rounds of panning on high binding 8-well strips coated with NP. The nanobody gene pool from the final phage output was cloned *en masse* into the pINQ-HAH6 vector for the expression of HA- and

6xHis-tagged nanobodies, and after electroporation into *E. coli* BL21(DE3) individual colonies were picked and grown in a 96-deep-well culture block. A screening was carried out on ELISA plates coated with either full-length NP or NP Δ 121, a truncated version of NP that lacks a highly conserved region in the N-terminal domain (NTD) (34, 35). Since nanobodies that react with NTD would be more likely to cross-react with NPs from other human coronaviruses, leading to false positives in diagnosis, we aimed to select nanobody candidates that reacted with NP Δ 121, in order to ensure the specificity of our sandwich ELISA by including at least one of them. At this stage, 92 clones were screened and the top ten clones with the highest readouts at high dilution (10^{-3}) against either NP or NP Δ 121 (indicating a high affinity and/or expression level) were selected (Supplementary Figure 1).

Using the phage output from the second round of panning as a starting point, another round of selection was performed in parallel to promote the selection of high affinity clones, by including an overnight competition step where bound phages were exposed to excess antigen in solution. Thus, lower k_{off} clones that eventually dissociated could react with the excess of soluble antigen and be washed off. Ten clones from the resulting phage output (named ON1 to ON10) were screened as described above, four of which were strongly positive (data not shown).

Through sequence analysis of the selected clones from both outputs, six unique sequences were found (Figure 1A), all of which possessed in framework 2 (FR2) the hallmark residues of VHH domains (as opposed to VH domains), i.e. F/Y42, E/Q49, R50 and F/G/L52 (36). The sequences appear to correspond to four different germ lines (F3, H4 and B4 seem to have diversified by somatic hypermutation). D5 presents two additional cysteine residues, most probably forming an extra disulfide bridge. Interestingly, F3 presents a putative N-glycosylation site in its CDR2, which could be a source of variability if it were to be expressed in mammalian cells. Protein expression of these clones was induced in 2 mL *E. coli* cultures, and cell lysate supernatants were titrated on ELISA plates coated with NP (Figure 1B). The clones with the highest relative affinity/expression level were selected, namely D5, H4 and ON10. In order to further characterize these clones and test them as potential pairs for the antigen-capture ELISA, the expression conditions were optimized for each one and they were produced on a larger scale and purified in two versions, either HA-tagged or site-specifically biotinylated through the use of AviTag (Figure 1C). Yields of purified protein ranged from 4.0 to 18.5 mg per liter of *E. coli* culture and were sequence-dependent.

3.2 The three selected nanobodies define non-overlapping epitopes and have nM affinity

Equilibrium dissociation constants (K_D) were determined by Bio-Layer Interferometry using the BLITz system (ForteBio). All three clones were shown to bind NP with high affinity, especially H4, with a determined K_D of 5.83×10^{-10} M compared to 2.21×10^{-9} M for D5 and 7.82×10^{-9} M for ON10 (Figure 1D; Supplementary Figure 2). Although the panning strategy for ON10 was aimed at selecting clones with a slow k_{off} rate, its K_D was hindered by a slow

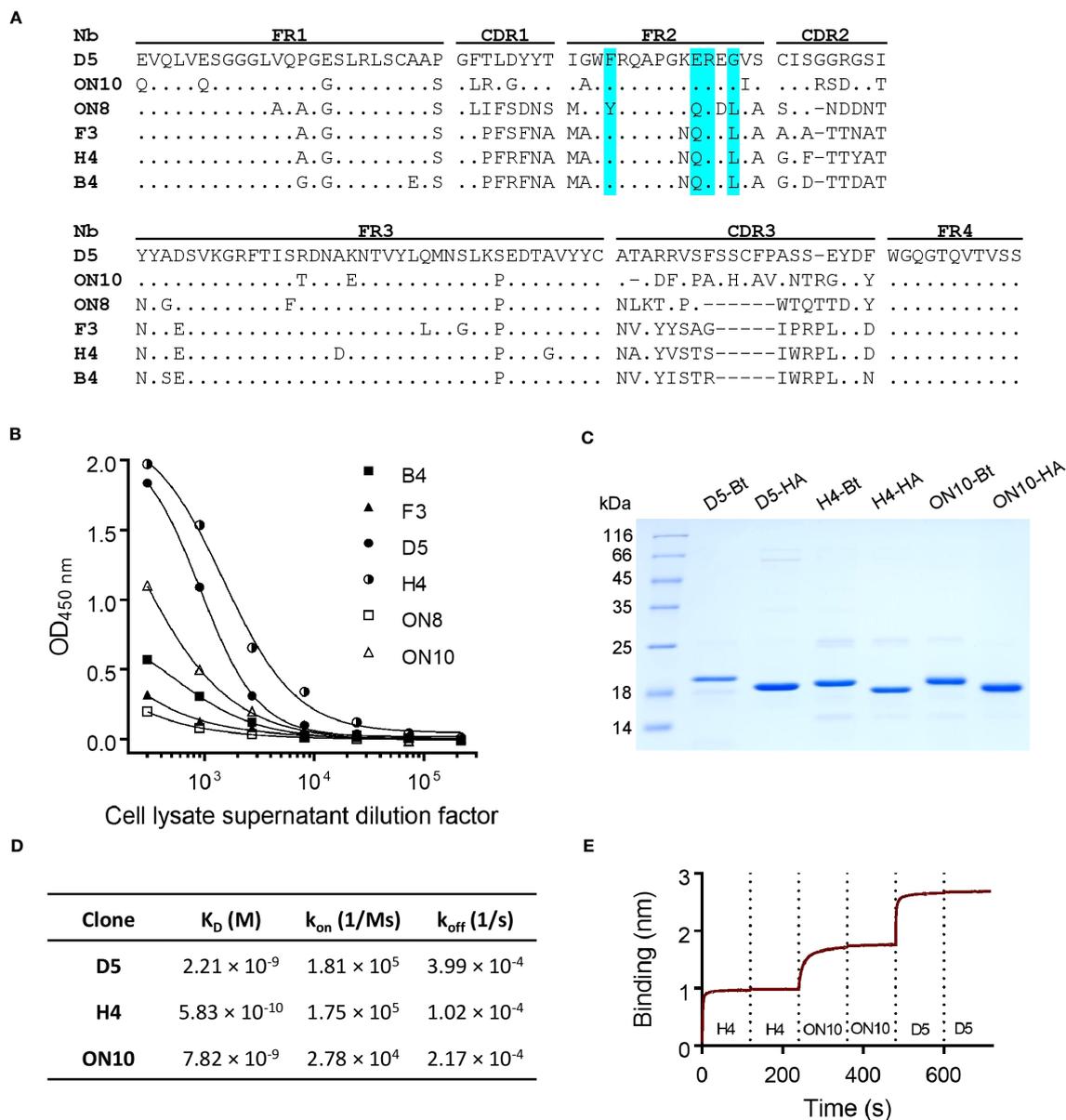


FIGURE 1 Anti-NP nanobody selection from phage display library, production and characterization. **(A)** Nanobody amino acid sequence alignment of six unique sequences. Dots represent identity and dashes represent gaps. The Framework (FR), Complementarity-Determining Regions (CDR) and hallmark residues of VHH (cyan) are shown. Nucleotide sequences are available at GenBank accession numbers OQ982376, OQ982375, OQ982379, OQ982378, OQ982374 and OQ982377, corresponding to D5, ON10, ON8, F3, H4 and B4 respectively. **(B)** Titration of cell lysate supernatants of six different clones on ELISA plates coated with NP. Higher reactivity represents greater affinity and/or relative expression levels. **(C)** SDS-PAGE of purified nanobodies. -Bt and -HA represent site-specifically biotinylated or HA-tagged nanobodies respectively. **(D)** Affinity and kinetic constants determined by Bio-Layer Interferometry (BLI) using immobilized NP. **(E)** Epitope binning BLI sensogram using immobilized NP. Each nanobody was included twice consecutively to ensure binding sites had been saturated.

k_{on} rate. Nevertheless, the use of both strategies broadened the repertoire of NP-specific nanobody sequences, which is important for the empirical optimization of two-site assays.

Epitope binning was performed by sequential exposure of the immobilized antigen on the biosensors to saturation concentrations of each nanobody. We found that the epitopes of the three clones did not overlap, as nanobodies could bind sequentially to their antigen regardless of the order in which they were added (Figure 1E; Supplementary Figure 3), indicating that these three clones could potentially constitute capture/detection pairs in a sandwich ELISA.

3.3 After pairwise selection, an NP colorimetric ELISA with a detection limit below ng/mL was obtained

As our group and others have previously reported (37–39), coating ELISA plates directly with nanobodies often results in inefficient antigen capture, presumably because their small size means that their structure and therefore also their antigen binding capability is compromised when they are adsorbed to the plate. To overcome this problem, biotinylated nanobodies were immobilized in

streptavidin-coated plates, ensuring in addition a more favorable spatial orientation of capture nanobodies. After the antigen-capture step, NP was detected using an HA-tagged nanobody followed by an anti-HA-HRP conjugate antibody (Figure 2A).

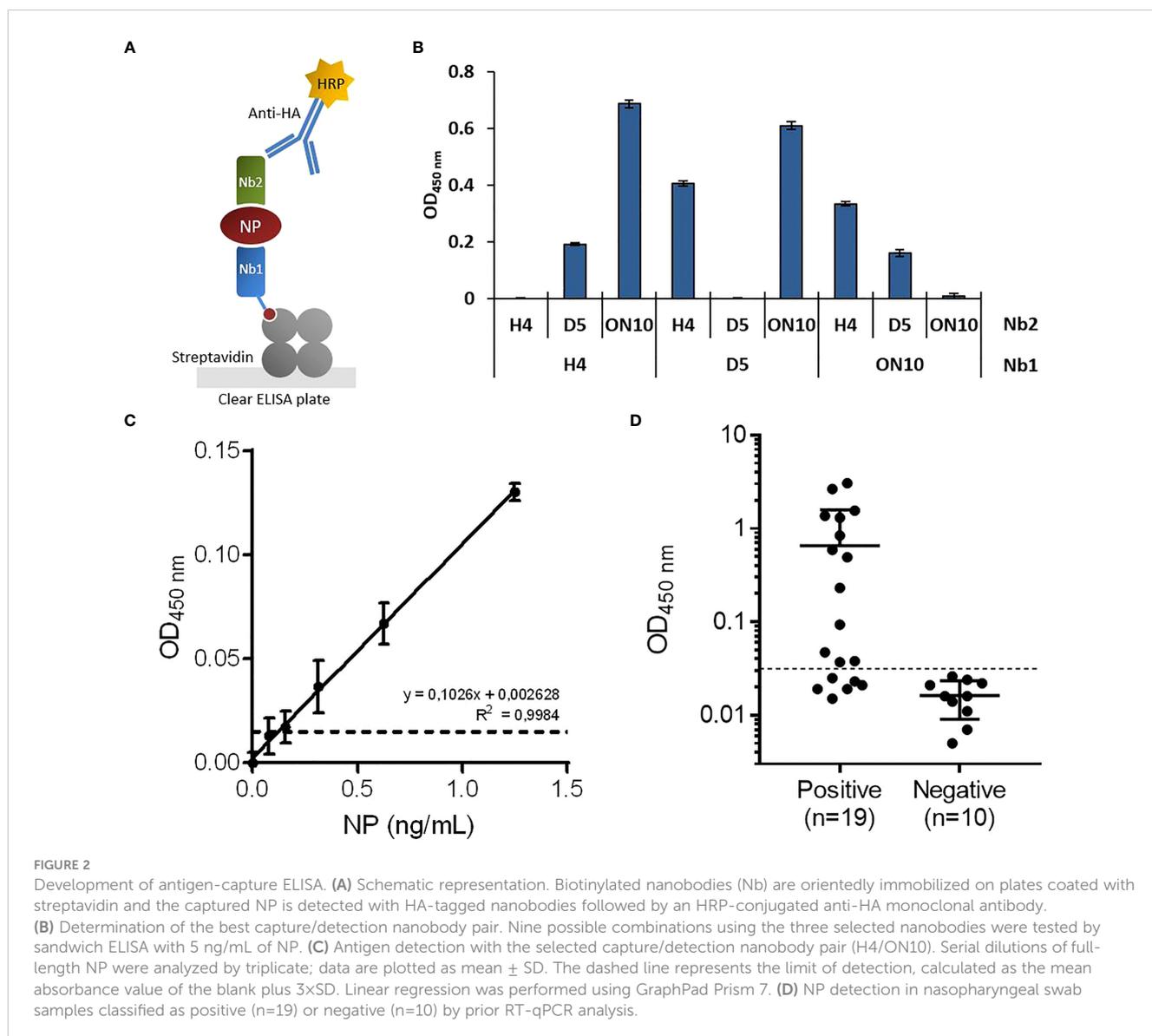
To determine the best capture/detection nanobody pair, all possible combinations were tested (Figure 2B). None of the pairs generated background signal, as measured in the absence of NP. The H4/ON10 pair produced the highest readout and was therefore selected to establish the NP antigen-capture ELISA. The nucleotide sequences of the cassettes used to produce the biotinylated Nb H4 and the HA-tagged Nb ON10 are shown in Supplementary Figures 4, 5, respectively (the corresponding plasmids are available at Addgene IDs 198690 and 198689). The H4 clone exhibited the highest affinity against NP, and it is specific for the less conserved C-terminal region (as it reacted with NPΔ121). Therefore, we expected it to contribute to generating not only a sensitive but also a highly specific assay.

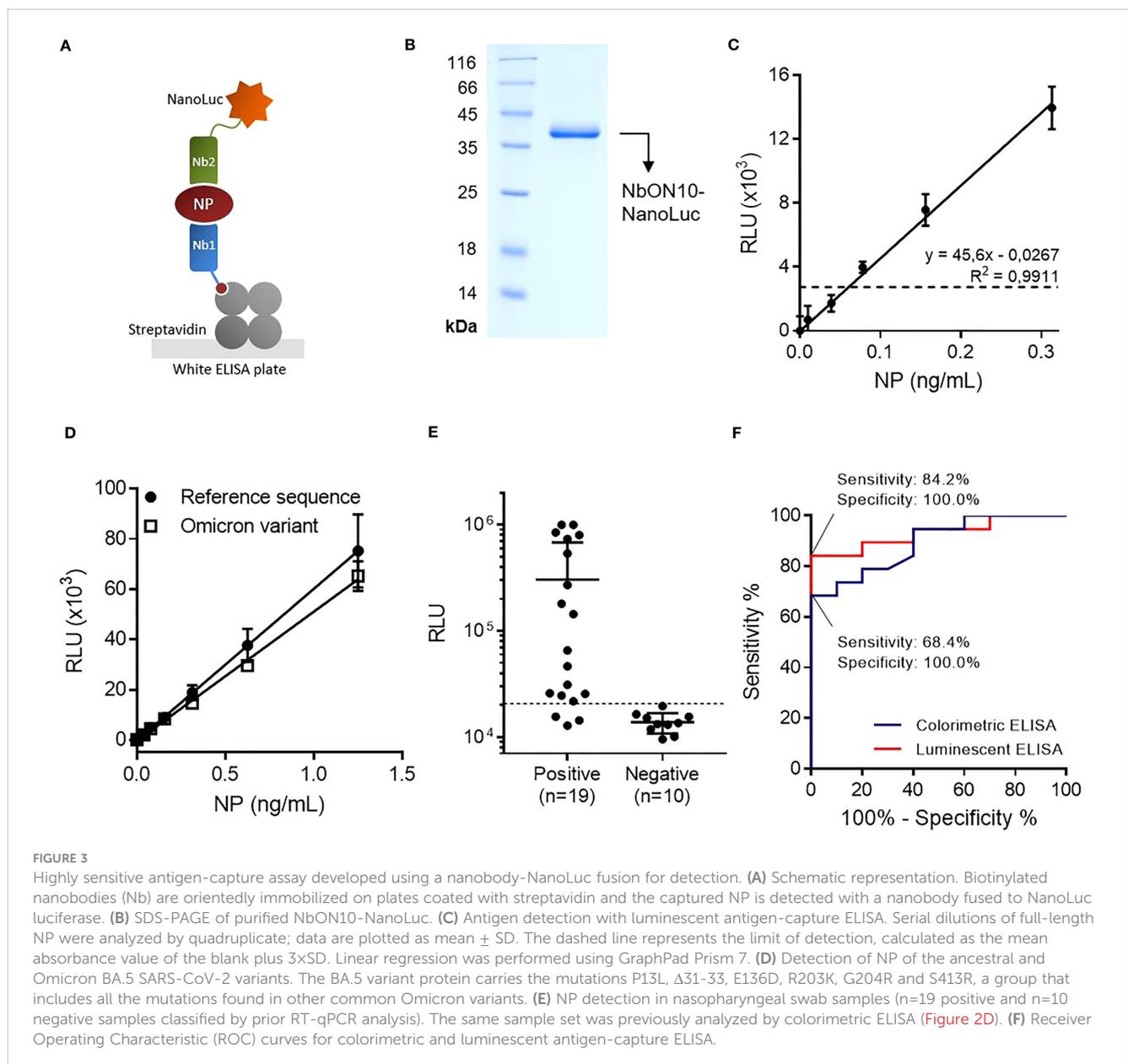
Titration curves were constructed using serially diluted full-length NP, and the limit of detection was determined to be 121 pg/mL

(Figure 2C). Next, we evaluated the assay's performance in relation to NP detection in clinical specimens. A group of previously RT-qPCR tested nasopharyngeal swab samples were analyzed, consisting of n=19 positive samples and n=10 negative samples. After a cutoff value was established through a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve by setting the specificity as 100.0% (95% confidence interval (CI): 69.2%-100.0%; Figure 3F), the assay presented a sensitivity of 68.4% (95% CI: 43.5%-87.4%), classifying as positive 13/19 of the RT-qPCR-positive samples (Figure 2D).

3.4 The simplicity and diagnostic power of the test were greatly improved by fusing the detection nanobody to NanoLuc

With the aim of improving the assay's sensitivity, we decided to develop a luminescent ELISA by producing the detection nanobody fused to NanoLuc (Figure 3A), a small (19 kDa) and highly stable





luciferase that produces an intense signal with excellent dynamic stability. First, we attempted to produce the NbON10-NanoLuc fusion in *E. coli* BL21(DE3). In previous work, our group had produced nanobody-NanoLuc chimeras in *E. coli* using unrelated nanobodies (unpublished work), however in this case expression was unsuccessful. A wide range of expression conditions were explored, including different culture media, a range of temperatures (20-37°C) and inducer concentrations (IPTG 1-1000 μ M), and codon optimization through the use of two different online servers (Genewiz, from Azenta Life Sciences, available at genewiz.com, and IDT Codon Optimization Tool, from Integrated DNA Technologies, available at idtdna.com). Although the protein was highly expressed, it was present exclusively in the form of inclusion bodies (data not shown). Refolding from purified inclusion bodies was also explored by following the protocol reported by Carlomagno et al (40), whereby a wide array of

refolding conditions were generated by combining different buffers (pH range 5-11) and additives (arginine 0.2-1 M, sucrose 0.2-1 M, glycerol 4-40% and PEG 5-20%), but luciferase activity could not be significantly recovered in any of the conditions screened (data not shown). These results, considered alongside our previous experience expressing these constructs, suggest their expression as soluble protein (as opposed to forming inclusion bodies) is nanobody sequence-dependent. Finally, we attempted the expression of NbON10-NanoLuc in the HEK293T cell line. The sequence was codon-optimized for humans, cloned into the pcDNA3.1(+) vector and transfected to be expressed in HEK293T cells. The nucleotide sequence of the cassette used to produce the chimera is shown in Supplementary Figure 6 (plasmid available at Addgene ID 198691). In this case, the protein was successfully expressed. Transient expression after 4 days yielded 17.6 mg of purified protein per liter of culture medium (Figure 3B).

By constructing titration curves using serially diluted full-length NP, we found that the luminescent assay had a limit of detection of 61 pg/mL, which represents a two-fold improvement in analytical sensitivity compared to the colorimetric assay (Figure 3C). Once this was established, we investigated whether the assay could detect the Omicron variant NP, as this is the most extensively mutated and currently dominant variant, accounting for nearly 100% of SARS-CoV-2 sequences shared on GISAID as of April 2023 (41). We tested the antigen-capture assay's ability to detect a mutated NP (Acro Biosystems, Cat. No. NUN-C52Hx) shared by the most dominant subvariants as of April 2023, including BA.5, BQ.1, BQ.1.1 and XBB (containing the mutations P13L, Δ 31-33, E136D, R203K, G204R, S413R) (42), and found that the assay was able to successfully detect it and produced similar readouts to the reference NP (Figure 3D). This result was expected since NP, being subject to low selective pressure in comparison with the surface receptor-binding Spike protein, has accumulated relatively few mutations.

The luminescent assay's performance in detecting NP in clinical specimens was initially evaluated using the same set of samples previously used to evaluate the colorimetric assay (n=19 positive samples and n=10 negative samples) (Figure 3E). Similarly, a cutoff value was established by constructing a ROC curve and setting the specificity as 100.0% (95% CI: 69.2%-100.0%; Figure 3F). With this sample set, the sensitivity was determined to be 84.2% (95% CI: 60.4%-96.6%), with 16/19 positive samples above the cutoff point.

3.5 The assay demonstrated high levels of specificity and sensitivity when tested with a large panel of clinical samples

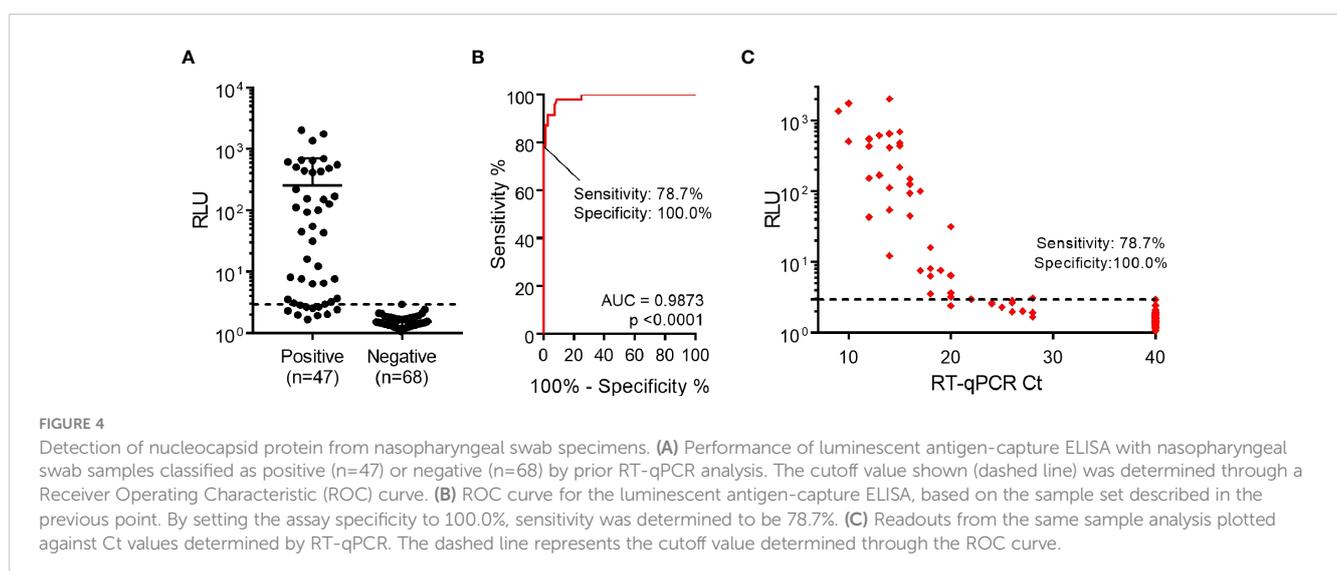
Finally, assay performance was evaluated using a larger set of samples (n=47 RT-qPCR-positive and n=68 RT-qPCR-negative samples). These samples represent the epidemiological landscape of March-April 2022 in Uruguay, a period when Omicron BA.1 was already the dominant variant, representing nearly 100% of new cases (33). After samples were analyzed by luminescent ELISA, a ROC

curve was constructed and specificity was set as 100.0% (95% CI: 94.7%-100.0%), determining the sensitivity to be 78.7% (95% CI: 64.3%-89.3%), with 37/47 positive samples correctly identified (Figures 4A, B). In addition, we observed a correlation between lower RT-qPCR Ct values and higher signals (Figure 4C). Notably, when considering the positive samples of Ct <24, assay sensitivity increased to 97.3% (95% CI: 85.8%-99.9%) (Supplementary Figure 7).

4 Discussion

The spread of SARS-CoV-2 infection precipitated the biggest public health emergency in recent times. New variants have posed increasingly greater challenges to existing immunity, generated either through natural infection or vaccination. In particular, the recent BQ and XBB subvariants have been shown to compromise the effectiveness of existing vaccines, including those that raise immunity against the Omicron BA.5 subvariant (43). Moreover, all available monoclonal antibody therapeutics fail to neutralize them (44). Although new reported cases are declining, the emergence of further new variants remains a possibility, and testing will continue to play an essential role in preventing the spread of COVID-19.

In this work, we aimed to develop an affordable and highly sensitive laboratory antigen test that allows for high-throughput analysis of untreated samples. To this end, high-affinity nanobodies with non-overlapping epitopes were selected from a phage display library constructed from the peripheral blood mononuclear cells of a llama immunized with SARS-CoV-2 NP. This protein has diverged significantly from the NP of other endemic human coronaviruses, presenting 48.5% identity with MERS-CoV, 36.7% with HCoV-HKU1, 28.8% with HCoV-229E, 48.3% with HCoV-NL63 and 38.4% with HCoV-OC43. However, it contains a highly conserved motif (FY YLGTGP) in the N-terminal domain (34, 35), which could be a source of cross-reactivity and compromise the assay's specificity. For this reason, a truncated version of NP devoid of this region (NP Δ 121) was produced, and nanobodies were screened against this antigen as well as full-length NP, with the



aim of ensuring that at least one of the nanobodies included in the assay was reactive against this less-conserved fragment. Although we could alternatively have used NPΔ121 for immunization and selection during panning, we decided against it in order to avoid the exclusion of potential high-affinity clones that bind to the more conserved region, or clones that might empirically be proven to constitute favorable pairs to maximize assay sensitivity. This approach proved successful, because of the three nanobodies selected through this strategy, only H4 binds to NPΔ121, while the remaining two (D5 and ON10) only bind to the full-length protein, suggesting their epitopes lie on the more conserved N-terminal region. The inclusion of H4 as a capture nanobody likely contributed to the high specificity observed in the resulting immunoassay. Nevertheless, this does not rule out the possibility of cross-reactivity of our assay with the NP of other endemic human coronaviruses. Unfortunately this could not be assayed, which represents a limitation of this work.

In order to test the applicability of the selected nanobodies for NP detection in a sandwich ELISA format, a colorimetric ELISA was initially developed, in which the detection nanobody was followed by an anti-HA-HRP secondary antibody. This detection system was subsequently replaced by the introduction of a nanobody-NanoLuc luciferase tracer, which reduced the assay time by eliminating the need for a secondary antibody and, more importantly, resulted in a two-fold increase in analytical sensitivity (Figure 3). Although this difference was less pronounced than we had anticipated based on previous reports (30), the analysis of nasopharyngeal swab samples using the luminescent assay showed a highly significant improvement in the clinical performance of the test. Notably, when only the samples with Ct <24 were considered, the luminescent assay attained a sensitivity of 97.3%. This is particularly important, since it has been shown that lower Ct values correlate with cell culture positivity and therefore with the presence of viable virus (45, 46). Correctly identifying these samples as positive is key in order to identify patients undergoing the period of highest infectiousness. As illustrated by the ROC curves, the selection of different cutoff values would be possible in order to allow for different sensitivity/specificity trade-offs. The relative advantages and drawbacks of prioritizing either parameter depend on the epidemiological circumstances as well as the testing protocols in place in a given setting (for instance, whether a follow-up RT-qPCR test is required in the case of a negative result).

The emergence of new variants, particularly subvariants of the Omicron lineage, poses a challenge to the effectiveness of vaccines and monoclonal antibody-based therapeutics. These mainly target the surface receptor-binding Spike protein, which is subject to high selective pressure and therefore presents the highest mutation rate among subvariants. NP is not subject to as much selective pressure, one of the characteristics that make it suitable for antigen detection tests. Nonetheless, the mutations that do emerge may affect the performance of diagnostic tests, and indeed it has been shown that for some tests the detection of recombinant NP that contains variant-associated mutations leads to a decrease in sensitivity (47, 48). To ensure that our assay was effective in

detecting the circulating variants, we evaluated the performance of our test using recombinant NP of the BA.5 subvariant, which carries mutations shared by current circulating subvariants such as XBB subvariants and found that it generated similar readouts to the reference NP (Figure 3D). More importantly, the clinical samples used to evaluate the assay were collected during the period of March–April 2022, when Omicron was already the dominant variant in Uruguay, thus suggesting that the clinical sensitivity reported corresponds to the detection of the currently circulating variant.

A major goal of this study was to develop a reliable SARS-CoV-2 antigen detection assay that could be reproduced by other laboratories. To the best of our knowledge, this is the first report of a fully-recombinant SARS-CoV-2 NP assay which has demonstrated its potential for the analysis of clinical samples and for which protein sequences have been made freely available. Additionally, this development demonstrates the value of using recombinant chimeric tracers, which constitute highly standardized and reproducible immunoassay reagents and contribute to reducing assay times.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Nucleotide sequencing data presented in the study are deposited in the GenBank repository, accession numbers OQ982374, OQ982375, OQ982376, OQ982377, OQ982378, OQ982379. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics statement

Ethical review and approval was not required for the study on human participants in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent from the participants' legal guardian/next of kin was not required to participate in this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements. The animal study was reviewed and approved by Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) Zoológico Parque Lecocq, Intendencia Municipal de Montevideo. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

Author contributions

PS-S participated in experimental design, performed most of the experiments, analyzed data, and wrote the manuscript draft. CP-R contributed to optimizing the expression and purification of NP. XS performed sample collection. CE performed llama immunization and blood draw. GL and GG-S participated in experimental design and discussion of results and revised the manuscript. GG-S conceived the study and organized the

manuscript writing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported with funds provided by CSIC 2007-348. PS-S and CP-R are recipients of scholarships from ANII and the Comisión Académica de Posgrado, UdelaR.

Acknowledgments

We are grateful to Andrés Abin and the staff of ATGen for kindly providing the anonymized leftover specimens used in this study.

Conflict of interest

XS is employed by ATGen SRL.

References

- To KK, Sridhar S. Lessons learned 1 year after sars-Cov-2 emergence leading to covid-19 pandemic. *Emerg Microbes Infect* (2021) 10(1):507–35. doi: 10.1080/22221751.2021.1898291
- Hacisuleyman E, Hale C, Saito Y, Blachere NE, Bergh M, Conlon EG, et al. Vaccine breakthrough infections with sars-Cov-2 variants. *N Engl J Med* (2021) 384(23):2212–8. doi: 10.1056/NEJMoa2105000
- Tuekprakhon A, Nutalai R, Dijokaite-Guraliuc A, Zhou D, Ginn HM, Selvaraj M, et al. Antibody escape of sars-Cov-2 omicron Ba.4 and Ba.5 from vaccine and Ba.1 serum. *Cell* (2022) 185(14):2422–33.e13. doi: 10.1016/j.cell.2022.06.005
- Mak GC, Cheng PK, Lau SS, Wong KK, Lau CS, Lam ET, et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of sars-Cov-2 virus. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc For Clin Virol* (2020) 129:104500. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104500
- Chu VT, Schwartz NG, Donnelly MAP, Chuey MR, Soto R, Yousaf AR, et al. Comparison of home antigen testing with rt-pcr and viral culture during the course of sars-Cov-2 infection. *JAMA Internal Med* (2022) 182(7):701–9. doi: 10.1001/jamainternmed.2022.1827
- Aranha C, Patel V, Bhor V, Gogoi D. Cycle threshold values in rt-pcr to determine dynamics of sars-Cov-2 viral load: an approach to reduce the isolation period for covid-19 patients. *J Med Virol* (2021) 93(12):6794–7. doi: 10.1002/jmv.27206
- Dramé M, Tabue Teguo M, Proye E, Hequet F, Hentzien M, Kanagaratnam L, et al. Should rt-pcr be considered a gold standard in the diagnosis of covid-19? *J Med Virol* (2020) 92(11):2312–3. doi: 10.1002/jmv.25996
- Behera BC, Mishra RR, Thatoi H. Recent biotechnological tools for diagnosis of corona virus disease: a review. *Biotechnol Prog* (2021) 37(1):e3078. doi: 10.1002/btpr.3078
- Binnicker MJ. Challenges and controversies to testing for covid-19. *J Clin Microbiol* (2020) 58(11):e01695–20. doi: 10.1128/JCM.01695-20
- Evans D, Cowen S, Kammel M, O'Sullivan DM, Stewart G, Grunert H-P, et al. The dangers of using cq to quantify nucleic acid in biological samples: a lesson from covid-19. *Clin Chem* (2022) 68(1):153–62. doi: 1093/clinchem/hvab219
- Cong Y, Ulasli M, Schepers H, Mauthé M, V'Kovski P, Kriegenburg F, et al. Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle. *J Virol* (2020) 94(4). doi: 10.1128/JVI.01925-19
- Schelle B, Karl N, Ludewig B, Siddell SG, Thiel V. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J Virol* (2005) 79(11):6620–30. doi: 10.1128/JVI.79.11.6620-6630.2005
- Surjit M, Lal SK. The sars-cov nucleocapsid protein: a protein with multifarious activities. *Infect Genet Evol* (2008) 8(4):397–405. doi: 10.1016/j.meegid.2007.07.004
- Chang C-K, Hou M-H, Chang C-F, Hsiao C-D, Huang T-H. The sars coronavirus nucleocapsid protein—forms and functions. *Antiviral Res* (2014) 103:39–50. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.12.009

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1220477/full#supplementary-material>

- Leung DTM, Tam FCH, Ma CH, Chan PKS, Cheung JLK, Niu H, et al. Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (Sars) targets the viral nucleocapsid. *J Infect Dis* (2004) 190(2):379–86. doi: 10.1086/422040
- Bar-On YM, Flamholz A, Phillips R, Milo R. Sars-Cov-2 (Covid-19) by the numbers. *Elife* (2020) 9. doi: 10.7554/eLife.57309
- Barlev-Gross M, Weiss S, Ben-Shmuel A, Sittner A, Eden K, Mazuz N, et al. Spike vs nucleocapsid sars-Cov-2 antigen detection: application in nasopharyngeal swab specimens. *Anal Bioanal Chem* (2021) 413(13):3501–10. doi: 10.1007/s00216-021-03298-4
- Isaacs A, Amarilla AA, Aguado J, Modhiran N, Albornoz EA, Baradar AA, et al. Nucleocapsid specific diagnostics for the detection of divergent sars-Cov-2 variants. *Front Immunol* (2022) 13:926262. doi: 10.3389/fimmu.2022.926262
- Lu R-M, Ko S-H, Chen W-Y, Chang Y-L, Lin H-T, Wu H-C. Monoclonal antibodies against nucleocapsid protein of sars-Cov-2 variants for detection of covid-19. *Int J Mol Sci* (2021) 22(22):12412. doi: 10.3390/ijms222212412
- Schuit E, Veldhuijzen IK, Venekamp RP, van den Bijllaardt W, Pas SD, Lodder EB, et al. Diagnostic accuracy of rapid antigen tests in asymptomatic and presymptomatic close contacts of individuals with confirmed sars-Cov-2 infection: cross sectional study. *BMJ* (2021) 374:n1676. doi: 10.1136/bmj.n1676
- Mathur S, Davidson MC, Anglin K, Lu S, Goldberg SA, Garcia-Knight M, et al. Evaluation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 nucleocapsid antigen in the blood as a diagnostic test for infection and infectious viral shedding. *Open Forum Infect Dis* (2022) 9(11):ofac563. doi: 10.1093/ofid/ofac563
- CDC. *Guidance for antigen testing for sars-Cov-2 for healthcare providers testing individuals in the community* (2022). Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>.
- Dinnes J, Sharma P, Berhane S, van Wyk SS, Nyaaba N, Domen J, et al. Rapid, point-of-care antigen tests for diagnosis of sars-Cov-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev* (2022) 7(7):CD013705. doi: 10.1002/14651858.CD013705.pub3
- Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyltermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* (1997) 414(3):521–6. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01062-4
- Muyltermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* (2013) 82(1):775–97. doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449
- Rossotti MA, Pirez M, Gonzalez-Techera A, Cui Y, Bever CS, Lee KS, et al. Method for sorting and pairwise selection of nanobodies for the development of highly sensitive sandwich immunoassays. *Analytical Chem* (2015) 87(23):11907–14. doi: 10.1021/acs.analchem.5b03561
- Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol* (2012) 7(11):1848–57. doi: 10.1021/cb3002478

28. Rossotti M, Tabares S, Alfaya L, Leizagoyen C, Moron G, Gonzalez-Sapienza G. Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. *Biochim Biophys Acta* (2015) 1850(7):1397–404. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.03.009
29. Tabares-da Rosa S, Rossotti M, Carleiza C, Carrion F, Pritsch O, Ahn KC, et al. Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity anti-hapten antibodies that are not favored in the llama immune response. *Analytical Chem* (2011) 83(18):7213–20. doi: 10.1021/ac201824z
30. Ren W, Li Z, Xu Y, Wan D, Barnych B, Li Y, et al. One-step ultrasensitive bioluminescent enzyme immunoassay based on Nanobody/Nanoluciferase fusion for detection of aflatoxin B(1) in cereal. *J Agric Food Chem* (2019) 67(18):5221–9. doi: 10.1021/acs.jafc.9b00688
31. McNaught AD, Wilkinson AIUPAC. Compendium of chemical terminology. In: *Gold book, 2nd Ed.* Hoboken, New Jersey: Blackwell Scientific Publications (1997).
32. Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, et al. Analysis of inactivation of sars-Cov-2 by specimen transport media, nucleic acid extraction reagents, detergents, and fixatives. *J Clin Microbiol* (2020) 58(11):. doi: 10.1128/jcm.01713-20
33. MSP. (2022). Available at: <https://www.gub.uy/Ministerio-Salud-Publica/Sites/Ministerio-Salud-Publica/Files/Documentos/Noticias/Informe%20epidemiológico%20200222.Pdf> (Accessed March 1st 2023).
34. 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(5624):1394–9. doi: 10.1126/science.1085952
35. Yu F, Le MQ, Inoue S, Thai HT, 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 Diagn Lab Immunol* (2005) 12(7):848–54. doi: 10.1128/CDLI.12.7.848-854.2005
36. Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman JJ, Niewold TA, Frenken LG, de Geus B. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol* (2000) 37(10):579–90. doi: 10.1016/s0161-5890(00)00081-x
37. Girt GC, Lakshminarayanan A, Huo J, Dormon J, Norman C, Afrough B, et al. The use of nanobodies in a sensitive Elisa test for sars-Cov-2 spike 1 protein. *R Soc Open Sci* (2021) 8(9). doi: 10.1098/rsos.211016
38. Scarrone M, González-Tejera A, Alvez-Rosado R, Delfin-Riela T, Modernell Á, González-Sapienza G, et al. Development of anti-human igm nanobodies as universal reagents for general immunodiagnosics. *N Biotechnol* (2021) 64:9–16. doi: 10.1016/j.nbt.2021.05.002
39. Ding Y, Cui P, Chen H, Li J, Huang L, González-Sapienza G, et al. “Ready-to-Use” immunosensor for the detection of small molecules with fast readout. *Biosensors Bioelectronics* (2022) 201:113968. doi: 10.1016/j.bios.2022.113968
40. Carlomagno M, Lassabe G, Rossotti M, González-Tejera A, Vanrell L, González-Sapienza G. Recombinant streptavidin nanopeptamer anti-immunocomplex assay for noncompetitive detection of small analytes. *Analytical Chem* (2014) 86(20):10467–73. doi: 10.1021/ac503130v
41. Emma Hodcroft (2023) CoVariants. Available at: <https://covariants.org/per-variant>.
42. National Center for Biotechnology Information (2023) SARS-CoV-2 Variants Overview. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/activ>.
43. Kurhade C, Zou J, Xia H, Liu M, Chang HC, Ren P, et al. Low neutralization of sars-Cov-2 omicron Ba.2.75.2, Bq.1.1 and Xbb.1 by parental mrna vaccine or a Ba.5 bivalent booster. *Nat Med* (2023) 29(2):344–7. doi: 10.1038/s41591-022-02162-x
44. Wang Q, Iketani S, Li Z, Liu L, Guo Y, Huang Y, et al. Alarming antibody evasion properties of rising sars-Cov-2 bq and xbb subvariants. *Cell* (2023) 186(2):279–86.e8. doi: 10.1016/j.cell.2022.12.018
45. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C, Colson P, et al. Viral rna load as determined by cell culture as a management tool for discharge of sars-Cov-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2020) 39(6):1059–61. doi: 10.1007/s10096-020-03913-9
46. Kohmer N, Toptan T, Pallas C, Karaca O, Pfeiffer A, Westhaus S, et al. The comparative clinical performance of four sars-Cov-2 rapid antigen tests and their correlation to infectivity in vitro. *J Clin Med* (2021) 10(2). doi: 10.3390/jcm10020328
47. Hagag IT, Pyrc K, Weber S, Balkema-Buschmann A, Groschup MH, Keller M. Mutations in sars-Cov-2 nucleocapsid in variants of concern impair the sensitivity of sars-Cov-2 detection by rapid antigen tests. *Front Virol* (2022) 2:971862. doi: 10.3389/fviro.2022.971862
48. Osterman A, Badell I, Basara E, Stern M, Kriesel F, Eletreby M, et al. Impaired detection of omicron by sars-Cov-2 rapid antigen tests. *Med Microbiol Immunol* (2022) 211(2-3):105–17. doi: 10.1007/s00430-022-00730-z

Supplementary Material

A highly sensitive nanobody-based immunoassay detecting SARS-CoV-2 nucleocapsid protein using all-recombinant reagents

Paula Segovia-de los Santos¹, Carolina Padula-Roca¹, Ximena Simon², Cesar Echaidés³, Gabriel Lassabe^{1*}, Gualberto Gonzalez-Sapienza^{1*}

¹Cátedra de Inmunología, DEPPIO, Facultad de Química, Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay.

²ATGen SRL, Montevideo, Uruguay.

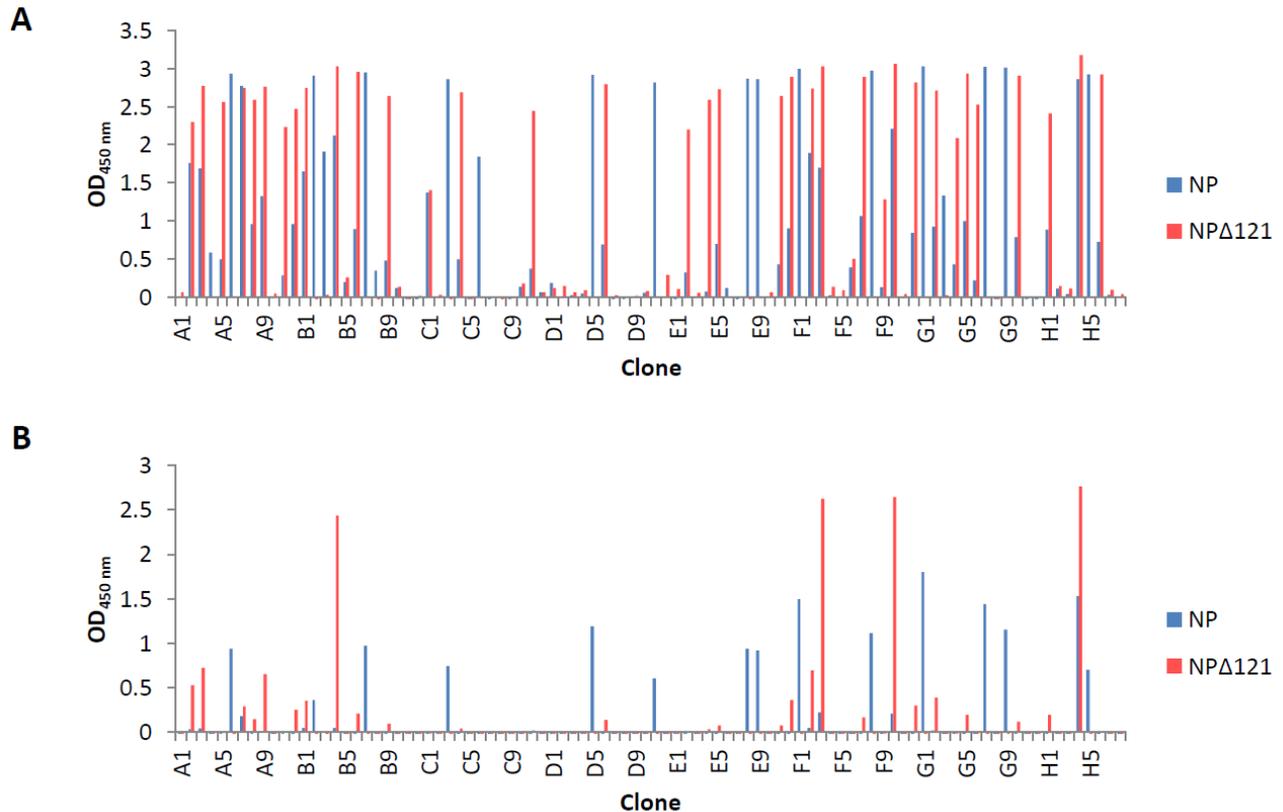
³Parque Lecocq, IMM, Montevideo, Uruguay.

*** Correspondence:**

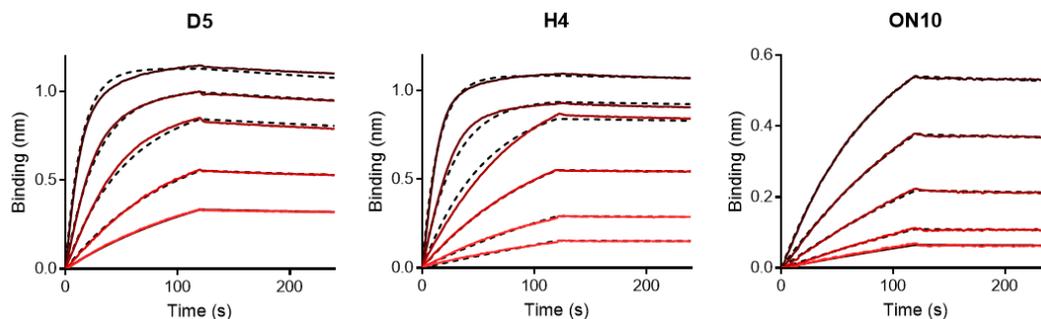
Gualberto Gonzalez-Sapienza
ggonzal@fq.edu.uy

Gabriel Lassabe
glassabe@fq.edu.uy

1 Supplementary Figures

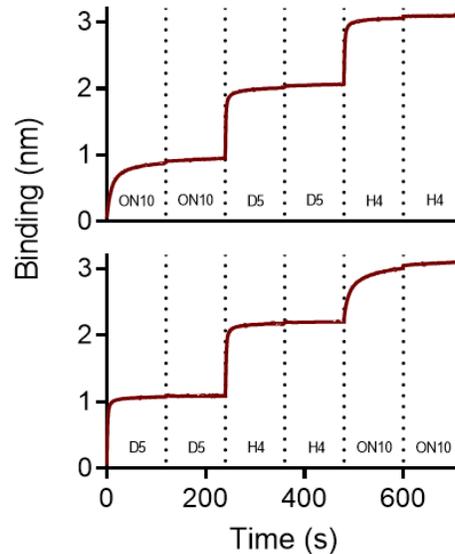


Supplementary Figure 1. Reactivity of 92 cell lysate supernatants from bacterial cultures of anti-NP clones. The reactivity was analyzed at a 10^{-1} (A) or 10^{-3} (B) dilution of the supernatants in ELISA plates coated with either full-length NP or streptavidin followed by biotinylated NPΔ121. The bound nanobodies were detected with an HRP-conjugated anti-HA monoclonal antibody.



Supplementary Figure 2. Bio-Layer Interferometry sensograms obtained for the determination of kinetic association and dissociation constants of selected anti-NP nanobodies. Association and dissociation of each nanobody was measured at concentrations of 400, 200, 100, 50, 25 and 10 nM

(the last one was only possible for H4) on amine-reactive biosensors with covalently immobilized full-length NP on the BLItz instrument (ForteBio). Data were globally fitted to a 1:1 binding ratio model (dashed lines).



Supplementary Figure 3. Sensograms for epitope binning of selected nanobodies using the BLItz instrument (ForteBio). Alternative binding orders for the different nanobodies were analyzed to confirm that epitopes were non-overlapping.

TCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTA
 CCGTGGCCAGGCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTCCCCTTCAGATTCAATGCCATGGCCTGGTTCGTCAGGCTCCAGGGAATCAGCGCGAGTTGGTCGCAGGTATTTTCA
 CTACATACGCCACAAATTATGCAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGACAAGAACACGGTCTATCTACAAATGA
 ACAGCCTGAAACCTGAGGACACAGGCGTCTATTACTGTAATGCAGCCTATGTCAGTACAAGTATTTGGCGCCCACTGTATGACGACTGGG
 GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGGCCAGGCCGCAAGGTGGCGGTCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGGC
 ACGAACTCGAG

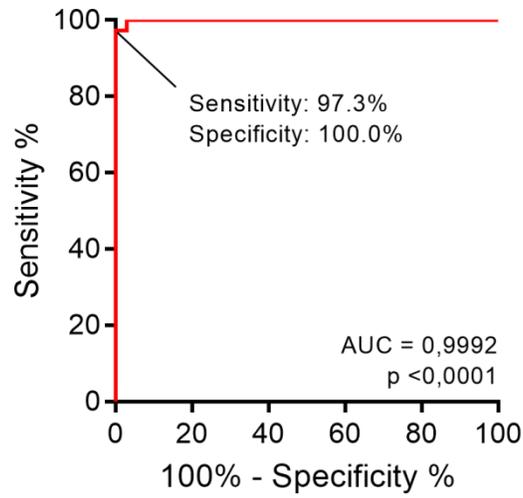
Supplementary Figure 4. Nucleotide sequence of the cassette encoding the capture nanobody H4. The color code is as follows: yellow, ribosome-binding site (RBS); green, OmpA signal peptide; pink, Nb H4; sky blue, Avi-tag. The sequence was cloned in the pET28a(+) vector between the XbaI and XhoI restriction sites.

TCTAGAAATAATTTTGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTA
 CCGTGGCCAGGCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCTGGGGGTTCCCTGAGACTCTCCTGTG
 CAGCCTCTGGATTACGTTTGGGTTATTATACCATAGCCTGGTTCGGCCAGGCCCCAGGGAAAAGAGCGCGAGGGTATCTCATGTATTAGTA
 GAAGTGACGGAAGCACATACTATGCAGACTCCGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCACGGACAACGCCGAGAACACGGTATATCTGCAAA
 TGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAGCGGATTTCTGCCGGCTCTCACTGTGCAGTGGCGAATACTAGGG
 GCTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCAGGCCAGGCCGGCCAGCACCATCACCATCACCATGGCGCATACCCGT
 ACGACGTTCCGGACTACGCTAGCGGATCCTAGTAGCTCGAG

Supplementary Figure 5. Nucleotide sequence of the cassette encoding the detection nanobody ON10 for colorimetric ELISA. The color code is as follows: yellow, ribosome-binding site (RBS); green, OmpA signal peptide; pink, Nb ON10; orange, 6xHis tag; sky blue, HA-tag. The sequence was cloned in the pET28a(+) vector between the XbaI and XhoI restriction sites.

GGATCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTGCCACTGGTGAAGCGGCCCCAGGCCGCCATG
 GCCCAGGTTCAACTGGTACAGAGCGGAGGGGCTTGTGTACAACCTGGAGGATCACTCAGACTGTCTTGGCGTGGCTCTGGGCTGCGACTT
 GGATATTATACCATAGCCTGGTTCAGACAGGCACCTGGAAAGGAGCGGGAGGGAATTAGTTGCATTAGTAGATCCGACGGGAGCACGTAT
 TACGCCGACTCCGTCAAAGGTCGATTTACAATATCCACGGACAACGCAGAGAACACAGTCTACCTCCAAATGAATAGTCTGAAACCAGAG
 GACACAGCCGTGATTACTGCGCCGACACTTTGTCCAGCCAGCCATTGTGCAGTAGCAAAACACACGCGGGTATGATTATTGGGGCAA
 GGTACCCAGGTCACGGTCAGCTCAAAGGCCAGGCCGGCCAGGGGGAGGTGGTTCTGGGGGTGGAGGCTCAGGCCGAGGAGGATCAGAA
 TTCATGGTGTTCACCTGGAAGATTTCTGTCGGTATTGGCGCCAGACAGCAGGATACAATTTGGATCAAGTGTGTTGAACAAGGGGGCGTG
 AGTAGTCTCTTCCAAATCTGGGTGTTTCAGTTACGCCTATCCAACGCATTGTACTGAGTGGCGAAAACGGCTTGAAAATTGACATCCAC
 GTCATCATTCCCTACGAAGGACTCAGTGGCGACCAATGGGGCAATAGAAAAGATTTTTAAGGTAGTTTACCCCGTGGATGACCACCAT
 TTTAAAGTAATTCTCCATTACGGAACGTTGGTCATAGATGGTGTACACCCAACATGATAGACTACTTTGGCCGCCCTTACGAGGGCATT
 GCCGTGTTTGACGGGAAGAAAATTACAGTACTGGAACATTGTGGAATGGTAATAAAATAATCGACGAACGCCTCATTAAACCAGATGGT
 TCCCTTCTGTTCGGCTGACGATAAACGGAGTCACTGGCTGGAGACTGTGTGAGCGCATCTTGGCGACCGGTCTCGAGGACGACGACGAC
 AAGCACCATCACCATCACCATGGGGCGGAGGCTCTGCTTGGAGTCATCCACAATTCGAAAAAGGTGGAGGTTCCGGAGGTGGATCGGGA
 GGTCTGCCTGGTCTCATCCACAATTTGAGAAGGCTAGCGGGGGTAATAGGCCGCCGCTTTAAATCTAGA

Supplementary Figure 6. Nucleotide sequence of the cassette encoding the detection nanobody ON10 fused to NanoLuc. The color code is as follows: green, I κ k leader; pink, Nb ON10; lilac, NanoLuc; orange, 6xHis tag; sky blue, Twin-Strep-tag. The sequence was cloned in the pcDNA3.1(+) vector between the BamHI and XbaI restriction sites.



Supplementary Figure 7. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve for the luminescent antigen-capture ELISA for positive samples of Ct <24. By setting the assay specificity to 100.0%, sensitivity was determined to be 97.3%.