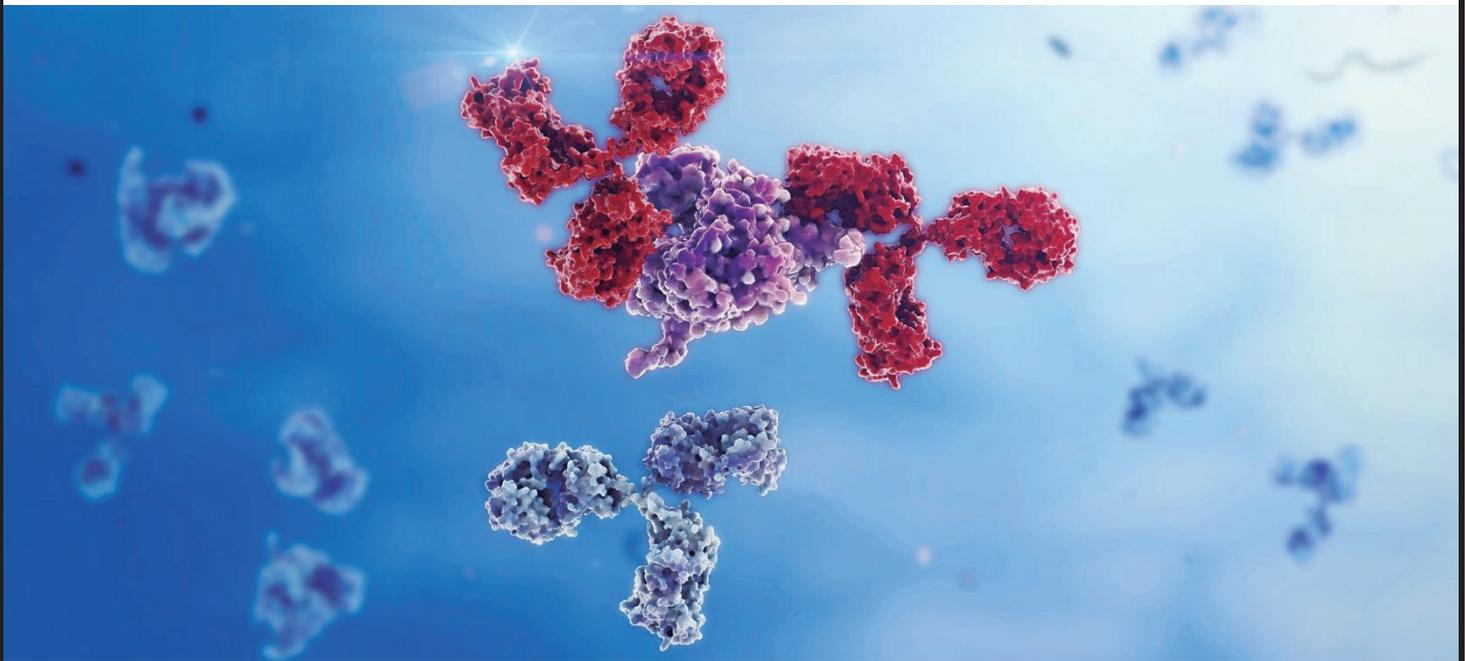


**Universidad Nacional de San Martín**

**Escuela de Ciencia y Tecnología – Escuela de Bio y  
Nanotecnologías**

**Centro de Rediseño e Ingeniería de Proteínas (CRIP)**



**Tesis para optar por el título de Licenciado en Biotecnología**

**“Desarrollo de un ELISA de cuantificación del dominio RBD  
de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2”**

**Autor: Miguel Angel Deriane**

**18 de noviembre de 2022**

**Dirección: Dra. María Laura Cerutti**

**Co-dirección: Dr. Diego Gabriel Nosedá**



*A mis padres, Ana y Jorge,  
por su amor, apoyo e incondicionalidad.*

## Agradecimientos

Transitar la carrera universitaria y culminarla con una tesis fue, muy probablemente, uno de los desafíos más importantes que emprendí hasta el momento. Atravesé momentos de muchísima alegría, tristeza, emoción, desasosiego, claridad y desorientación. Sin embargo, nunca caminé en soledad. Por eso, quiero agradecer a todas las personas que de alguna u otra manera estuvieron ahí para mí durante todos estos años.

En primer lugar, quisiera agradecer a la Universidad Nacional de San Martín y en especial, a la Escuela de Ciencia y Tecnología y a la Escuela de Bio y Nanotecnologías por haberme brindado el espacio de formación para convertirme en un profesional de la educación pública, gratuita y de calidad. Desde el primer momento hice de la Universidad mi segundo hogar. La belleza del campus, la amabilidad y disposición de su gente, y las oportunidades para volar siempre un poco más alto, me hicieron amar este lugar desde el primer momento que entré. Voy a extrañar pasar mis días enteros estudiando en esta casa, en donde las horas parecieron minutos y los años se pasaron volando.

Luego, quiero agradecer al grupo que me acompañó durante el desarrollo de este trabajo. Lau, mi directora, por la gran generosidad con su conocimiento y la confianza en mis capacidades desde el momento cero. A Diego, mi co-director, por estar siempre atento. A Claudio por su disponibilidad y enriquecer con su experiencia. A Ale, por hacer los días en el laboratorio más divertidos. Y a Euge que, además de una excelente compañera de la cual aprendí muchísimo, también se convirtió en una amiga.

A mis amigos, los de toda la vida y los más nuevos, por demostrarme que la amistad es tan importante como la familia. Gracias Fer, Viole, Euge, Meli, Enzi, Mati, Tati, Sara, Dan, Manu, Coqui, Dani, Caro por ser un pilar tan fundamental de mi vida. Los quiero mucho y gracias por estar siempre.

A mi grupo de Toxicxs, por estar siempre disponibles para discutir un paper científico, un tema político, una banalidad de la tele, o un tema personal. Gracias por transitar este camino conmigo. Los quiero tanto May, Mechi, Mili, Maxi y Joel.

A mis grupos de Potsdam y VT, por demostrarme que en tan poco tiempo se pueden formar lazos tan fuertes. Gracias por compartir conmigo experiencias únicas e irrepetibles. Los quiero desde Argentina hasta Alemania. También gracias a Valeria y a Susana, de Relaciones Internacionales, por acompañarme siempre con tanto cariño y apoyo en mis proyectos de internacionalización.

A mi familia entera, por brindarme apoyo incondicional. A mis abuelas, que son de oro, y a mis primos y tíos, que quiero tanto.

A Luchi, mi mejor amiga, por ser una segunda hermana para mí. Pocas personas me conocen tanto como vos. Gracias por tu incondicionalidad. Te amo muchísimo y espero tenerte siempre a mi lado.

A Lucía, mi hermana, por aguantarme con tanto cariño y entenderme a su manera. Sos una persona indispensable a la que espero poder cuidar siempre. Gracias por cuidarme vos también a mí. Te amo.

Por último, a los pilares de mi vida, de quienes aprendí y aprendo todos los días: mamá y papá. Gracias por tanta entrega y por tanta fuente de inspiración. Su esfuerzo inculdicable no sólo me abrió muchísimas puertas, si no que me enseñó a luchar por mis sueños. Los amo para siempre y espero no defraudarlos nunca.

## Resumen

La pandemia de COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2, ha generado hasta el momento alrededor de 600 millones de contagios y más de 6 millones de muertes, y sigue siendo motivo de preocupación global. Entre las proteínas virales, la proteína estructural S o *Spike* juega un rol preponderante en el establecimiento de la infección a través de la interacción con el receptor humano ACE-2. Dentro de *Spike*, es el dominio RBD el que establece los contactos con ACE-2 que gatillan, en última instancia, la fusión de las membranas y la ulterior liberación del genoma viral dentro de las células. Por la naturaleza de su mecanismo de acción, gran parte de los anticuerpos neutralizantes generados durante la infección por SARS-CoV-2 están dirigidos contra el dominio RBD. De hecho, durante el año 2020, nuestro grupo ha participado en la producción de RBD como antígeno para la inmunización de equinos, a partir de los cuales se obtuvo un suero policlonal con capacidad neutralizante llamado CoviFab®. Este y otros tantos desarrollos muestran que la industria biotecnológica ha puesto su foco sobre el dominio RBD, ya sea para su uso en reactivos de diagnóstico, agentes terapéuticos y/o vacunas. A fin de cumplir con la alta demanda de producción RBD recombinante, todos los laboratorios productores se vieron en la necesidad de aumentar nuestra productividad. Por lo tanto, surgió la necesidad de contar con un método de cuantificación preciso de este dominio a partir de muestras de sobrenadantes de cultivos de los sistemas de expresión más comúnmente empleados para su producción en la industria biotecnológica, como las células de mamífero o las levaduras. Existen diversas maneras de cuantificar una proteína dentro de una matriz compleja, pero destacan los inmunoensayos tipo ELISA dado que usan anticuerpos, que son biomoléculas con una muy alta especificidad y afinidad. En la actualidad, existen algunos kits de ELISA comerciales para la cuantificación de RBD en muestras de plasma y medios condicionados, los cuales ofrecen muy buenos resultados. Sin embargo, ninguno de ellos es de origen nacional, lo que dificulta su accesibilidad tanto por sus costos como por los largos tiempos de espera para su importación. En base a todos estos antecedentes, en este trabajo se ha abordado el desarrollo de un ELISA de cuantificación del dominio RBD a partir de muestras bioprocesos. Los resultados aquí presentados demuestran que hemos podido lograr un prototipo de ensayo con límites de cuantificación menores al ng/ml, similares a los obtenidos en productos comerciales similares. Creemos que este desarrollo tecnológico impactará positivamente en la industria biotecnológica local y en grupos de investigación científica, aportando una poderosa herramienta de control de calidad y optimización del proceso de producción de este antígeno clave para el control de la pandemia de COVID-19.

## Abstract

COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2 virus, has produced around 600 million infections and more than 6 million deaths, and it is still a global concern. Among all viral proteins, the structural S protein or *Spike* plays an important role in the infection through the interaction with the human receptor ACE-2. Within Spike protein, it is RBD domain which establishes chemical contacts with ACE-2 that end up fusing both membranes, releasing the viral genome into the cells. Due to its mechanism of action, most of the neutralising antibodies generated during SARS-CoV-2 infection are directed against RBD domain. In fact, during 2020, our group participated in RBD production as antigen for horses immunization, from which a serum with neutralising capacity was taken as a therapeutic product (CoviFab<sup>®</sup>). This and other developments show that the biotech industry has been focusing on RBD domain, either for diagnostic, therapeutic or vaccination purposes. In order to supply recombinant RBD to the demanding industry, all producer labs had to increase their productivity. Therefore, it became necessary to have a precise quantification method for this domain able to assess samples from supernatants of cell cultures commonly used in RBD production, such as mammal cells or yeasts. There are different ways of quantifying a protein within a complex matrix but ELISA assay is particularly interesting since it uses antibodies which are highly specific and high-affinity biomolecules. Nowadays, there are some commercial ELISA kits for RBD quantification from plasma and other conditioned medium, which offer very good performances. However, none of them is produced by the national industry, which makes it difficult to get them because of the prices and the import times. Altogether, in this work we have developed an RBD ELISA quantification assay from bioprocess samples. The results presented here show that we have succeeded in getting an assay prototype with a limit of quantification of less than a ng/ml, similar to other commercial kits. We believe that this technological development will positively impact on both the local biotech industry and research groups, being a powerful tool for quality control and RBD process optimization.

## Índice

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>10</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>12</b>
<i>SARS-CoV-2 y el dominio RBD.....</i>	<i>12</i>
<i>RBD en la industria biotecnológica.....</i>	<i>18</i>
<i>Cuantificación de proteínas recombinantes en muestras de bioprocesos.....</i>	<i>21</i>
<i>Anticuerpos y Anticuerpos Monoclonales.....</i>	<i>24</i>
<i>Ensayo de ELISA. ELISA tipo Sándwich.....</i>	<i>29</i>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>34</b>
<b>Objetivo general.....</b>	<b>34</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>35</b>
<i>Producción y purificación de las proteínas recombinantes en células de mamífero.....</i>	<i>35</i>
Seuencias de los plásmidos utilizados.....	35
Amplificación del DNA por la metodología de Megaprep.....	37
Cultivo celular y transfección de la línea HEK293T y de la línea en suspensión Expi293™.....	38
Cosecha, purificación y almacenamiento de las proteínas recombinantes.....	41
<i>Desarrollo y producción de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopes discontinuos de RBD.....</i>	<i>42</i>
Estudios de desnaturalización de RBD por espectroscopía de fluorescencia intrínseca de triptófanos.....	42
Desarrollo de un método de Screening para la evaluación de la reactividad IgG dirigida contra epitopes discontinuos de RBD.....	42
Planes de inmunización.....	43
Titulaciones de los sueros anti-RBD.....	43
Fusión celular y evaluación de la reactividad.....	44
Clonación de los mAbs y criopreservación de la línea.....	46
Purificación de los mAbs.....	47

<i>Caracterización de los mAbs</i> .....	48
<i>Marcación de los anticuerpos monoclonales con biotina</i> .....	49
<i>Elección del par de mAbs para el ensayo de captura</i> .....	50
<i>Puesta a punto del ensayo de cuantificación</i> .....	51
Determinación de la dilución de la Strp-HRP (ROCHE) .....	51
Determinación de la concentración del anticuerpo de detección .....	51
Ensayo de competición .....	51
<i>Ensayo de cuantificación</i> .....	52
Protocolo del Ensayo de Cuantificación Final (Curva estándar + Spike-and-recovery) .....	52
Determinación de atributos analíticos .....	52
<b>Resultados</b> .....	<b>54</b>
<i>Producción y purificación de las proteínas recombinantes en células de mamífero</i> .....	54
Producción de RBD .....	54
Producción de ACE-2 .....	58
Adaptación de la línea celular Expi293F™ al medio Ex-Cell CD Viral Vector™ .....	61
<i>Desarrollo y producción de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína RBD en estado nativo</i> .....	62
Desarrollo de un método de Screening para la evaluación de la reactividad IgG dirigida contra epitopes discontinuos de RBD.....	62
Caracterización y titulación de los sueros de animales inmunizados con el dominio RBD .	65
Generación de hibridomas y clonación de las líneas productoras de mAbs anti-RBD nativa exclusivamente.....	67
Purificación de los mAbs .....	69
<i>Caracterización de los mAbs</i> .....	71
Western Blot .....	71
Complejo ternario .....	72
<i>Marcación de los anticuerpos monoclonales con biotina</i> .....	73
<i>Elección del par de mAbs óptimo para el ensayo de captura</i> .....	74

Titulación de los mAbs anti-RBD .....	75
<i>Puesta a punto del ensayo</i> .....	77
<i>Ensayo de cuantificación final</i> .....	79
<b>Discusión</b> .....	<b>88</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>94</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>96</b>

## Abreviaturas

**4PL:** Regresión logística de 4 parámetros

**5PL:** Regresión logística de 5 parámetros

**A205:** Absorbancia a 205 nm

**A260:** Absorbancia a 260 nm

**A280:** Absorbancia a 280 nm

**A450:** Absorbancia a 450 nm

**ACE-2:** Enzima convertidora de angiotensina 2

**Alum:** Sales de hidróxidos y fosfatos de aluminio trivalente

**AP:** Fosfatasa alcalina

**CDR:** Regiones determinantes de la complementariedad

**DMEM 10%:** Medio de cultivo DMEM con agregado de 10% de SFB

**DMEM 2%:** Medio de cultivo DMEM con agregado de 2% de SFB

**DNA/ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ELISA:** Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

**Fc:** Fracción constante

**HAT:** Hipoxantina, Aminopterina y Timidina

**Hb:** Hibridoma

**HGPRT:** Enzima hypoxantina-guanina fosforibosiltransferasa

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta performance

**HPRT1:** Gen que codifica para la enzima hypoxantina-guanina fosforibosiltransferasa

**HRP:** Enzima peroxidasa de rábano picante

**HT:** Hipoxantina, Timidina

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IMAC:** Cromatografía de afinidad a quelatos metálicos inmovilizados

**K<sub>D</sub>:** Constante de disociación

**mAb:** Anticuerpo monoclonal

**MSE:** Error cuadrático medio

**NABs:** Anticuerpos neutralizantes

**NSP:** Proteínas no estructurales (del inglés *Non-structural proteins*)

**OPD:** dihidrocloruro de o-fenilenediamina

**ORF:** Marco abierto de lectura (del inglés *Open-Reading-Frame*)

**PBS:** Buffer fosfato salino

**PEG:** Polietilenglicol

**PEI:** Polietilenmina

**PRR:** Receptores de reconocimiento de patrones

**RBD:** Dominio de unión al receptor (del inglés *Receptor-Binding-Domain*)

**RBM:** Motivo de unión al receptor (del inglés *Receptor-Binding-Motif*)

**RNA/ARN:** Ácido ribonucleico

**RTC:** Complejo de replicación y transcripción (del inglés *Replication and transcription complex*)

**SDS:** dodecil sulfato de sodio

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

**SFB:** Suero fetal bovino

**SN NS0:** Sobrenadante de células NS0

**SNR:** Suero normal de ratón

**SPR/RPS:** Resonancia de plasmónica de superficie

**SS:** Suma de cuadrados

**Strp-HRP :** Estreptavidina acoplada a la enzima HRP

**SYX:** Error estándar de la estimación

**TA:** Temperatura ambiente

**TMB:** tetrametilbencidina

**VC:** Volumen de columna

**VOC:** Variante de preocupación (del inglés *Variant of Concern*)

## Introducción

### *SARS-CoV-2 y el dominio RBD*

En diciembre de 2019, en la ciudad de Wuhan, comenzaron a reportarse diversos casos de neumonía de origen desconocido, los cuales alarmaron fuertemente a la comunidad médica por la facilidad de su transmisión y la gravedad del cuadro clínico de los casos [1]. Rápidamente, se identificó al patógeno causante de la enfermedad como un nuevo coronavirus tipo SARS<sup>1</sup>, al que se lo denominó SARS-CoV-2 y a la enfermedad causada por el mismo, COVID-19. Debido a su alta transmisibilidad, esta enfermedad se esparció rápidamente por diversos países del mundo, siendo declarada como pandemia por la Organización Mundial de la Salud el día 11 de marzo de 2020 [2]. Desde ese entonces, se han producido cerca de 600 millones de contagios y más de 6 millones de muertes [3].

La enfermedad puede presentarse con síntomas moderados o severos. Las manifestaciones moderadas de la enfermedad suelen ser similares a las observadas en resfríos estacionales (fiebre, dolores de cabeza, tos, dolores musculares y cansancio). Por otro lado, las manifestaciones severas pueden incluir el desarrollo de neumonía, Síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y falla multiorgánica, las cuales pueden conducir a la internación en terapia intensiva o incluso a la muerte [1].

El patógeno causal de la pandemia de COVID-19 es el virus SARS-CoV-2. Diversos estudios filogenéticos revelaron que este virus está altamente relacionado con los beta-coronavirus, un género dentro de la subfamilia *Coronavirinae* [4]. Al igual que otros coronavirus, el SARS-CoV-2 presenta un genoma de RNA de cadena simple positiva [(+) ssRNA], con un 5'-cap y un extremo 3' UTR poliadenilado. El tamaño del genoma es de alrededor de 30 kb y contiene 14 marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican para 29 proteínas virales, algunas de las cuales son **proteínas estructurales**, otras **no-estructurales (NSP)** y otras llamadas **proteínas accesorias**. En particular, en el extremo 5' del genoma viral se codifican 2 poliproteínas llamadas pp1a y pp1ab, que son digeridas por proteasas virales en 16 NSP que cumplen funciones importantes en el establecimiento del complejo de replicación y transcripción viral (RTC). Por otro lado, en el extremo 3' del genoma viral, se codifican diversas proteínas accesorias y 4 proteínas estructurales, cuya función está relacionada con el establecimiento de la infección como así también con el ensamblado de la partícula viral. Todas estas proteínas son incorporadas en la

---

<sup>1</sup> La sigla SARS hace referencia al síndrome respiratorio agudo causado por un coronavirus. A los coronavirus causantes de estos síndromes se los conoce como SARS-CoV [113]

estructura final del virión, lo que no ocurre para las proteínas accesorias., Dentro de las proteínas estructurales se encuentran la proteína de la nucleocápside (N), la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína de la espiga (S o *Spike*) [5](Figura 1).

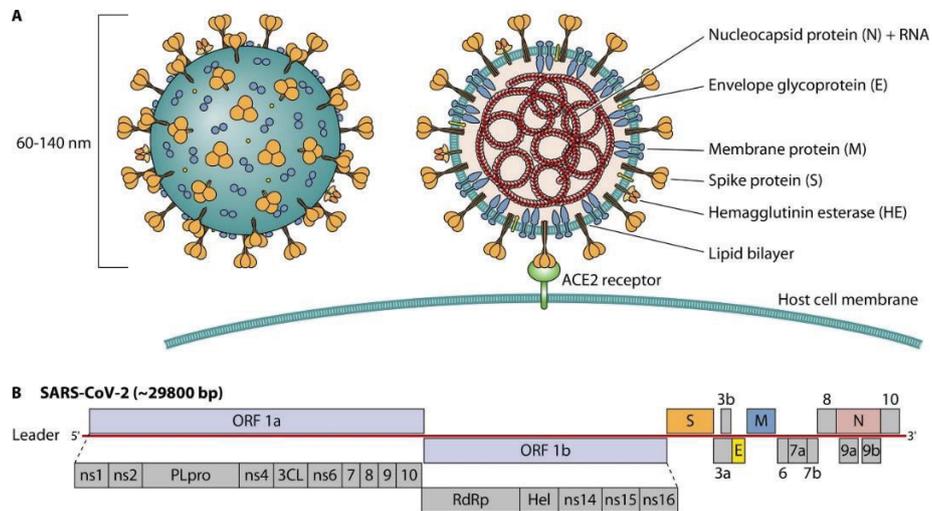


Figura 1: Organización genómica del SARS-CoV-2 con los dominios funcionales mostrados en forma de rectángulo. Imagen extraída de [6].

La proteína **Spike** juega un rol central en el ciclo viral, dado que es la encargada de mediar la interacción de la partícula viral con su receptor en la célula huésped: **la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2)**. A partir de esta interacción, se gatilla la fusión de las membranas y la ulterior liberación del genoma viral dentro de las células. Una vez dentro, los ribosomas son capturados para producir las dos poliproteínas ya mencionadas (ppa1 y ppa1ab) que luego son procesadas por dos proteasas virales, la proteasa principal M<sup>pro</sup> y la proteasa papaína-like PL<sup>pro</sup> para dar las NSP que forman el complejo RTC, que inicia la replicación y transcripción viral. Finalmente, el RNA genómico replicado y las proteínas estructurales se ensamblan en la partícula viral, que es liberada de la célula por exocitosis para iniciar un nuevo ciclo de infección como se puede ver en el esquema de la **Figura 2** [7].

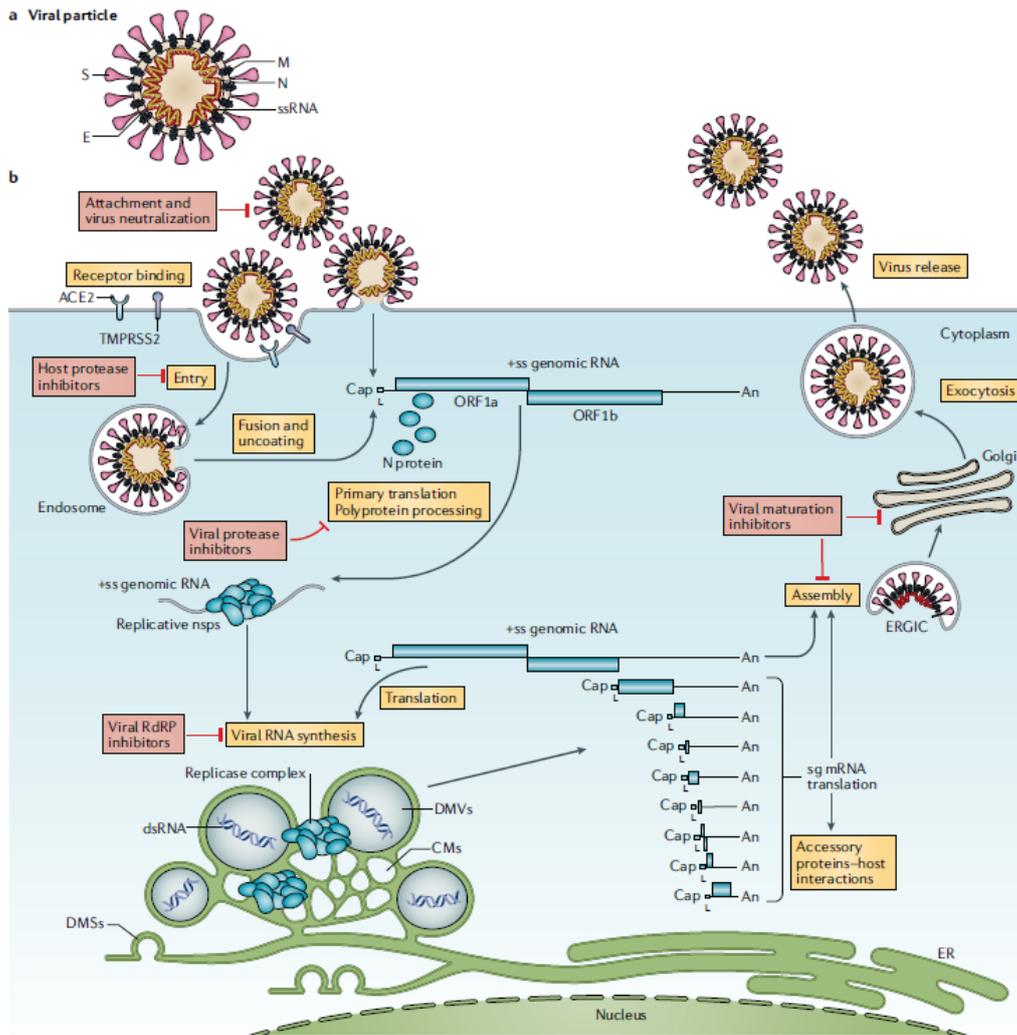


Figura 2: Esquema que representa el ciclo viral. Extraída de [7].

Dada la enorme importancia de la proteína S en el establecimiento de la infección, ésta ha sido objeto de exhaustivos estudios celulares e inmunológicos, pero también biofísicos y estructurales. La proteína S protruye de la estructura del virión, decorándola como una corona, razón por la cual se acuñó este nombre para este grupo de virus cuando se caracterizaron por microscopía electrónica en 1963 por la viróloga June Almeida [8]. La proteína Spike es un homotrímero altamente glicosilado, que pertenece a la familia de proteína de fusión de membrana tipo I. La proteína comprende alrededor de 1200 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular del orden de 180–200 kDa. Como otras proteínas de la familia I, cada monómero es clivado proteolíticamente, en este caso para dar las subunidades que constituyen cada monómero: S1 y S2. De hecho, la entrada del virus a las células depende de la interacción de la subunidad de superficie S1 con ACE-2 para facilitar el *attachment* a la superficie de las células hospedadoras. Una vez establecida esta interacción, la proteína S es clivada por la serin-proteasa celular TMPRSS2 en los sitios S1/S2 y S2' de manera de exponer un péptido de fusión presente

en S2 que facilita la fusión de las membranas y la consecuente entrada del RNA genómico viral al citosol (**Figura 3**) [9] [10]. Este mecanismo es análogo al observado para el virus SARS-CoV-1.

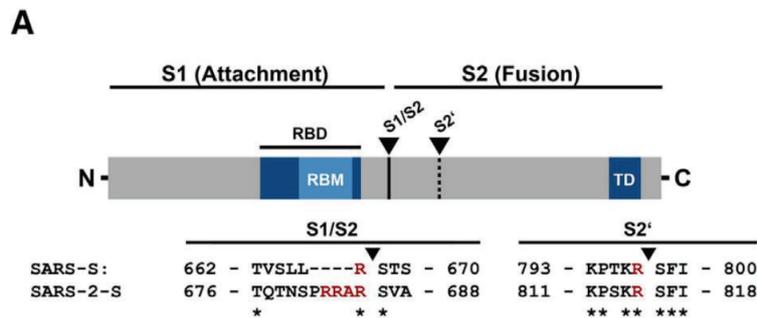


Figura 3: Ilustración esquemática de los dominios funcionales de la proteína S. En particular, se destacan el dominio RBD, el motivo RBM, el dominio transmembrana (TM) y los sitios de clivado proteolítico (con flechas). Se muestran debajo del esquema las secuencias aminoacídicas alrededor del sitio de corte, en donde los asteriscos representan sitios conservados entre el SARS-CoV-1 y el SARS-CoV-2. Imagen extraída de [10].

En particular, dentro de S1, es el **dominio RBD** (por *Receptor-Binding-Domain*) el que interactúa de forma directa con la enzima ACE-2. El dominio RBD contiene un *core* de 5 hojas  $\beta$  antiparalelas, flanqueadas a cada lado por una pequeña  $\alpha$ -hélice. También posee en su estructura una gran proporción de regiones flexibles o desordenadas. El motivo de unión (RBM), que es la secuencia dentro de RBD que establece contacto con los residuos de ACE-2, se extiende por fuera del core de hojas beta conectando  $\beta 4$  con  $\beta 5$ . Este motivo presenta una considerable flexibilidad y se estabiliza principalmente por puentes disulfuro (**Figura 4**) [5].

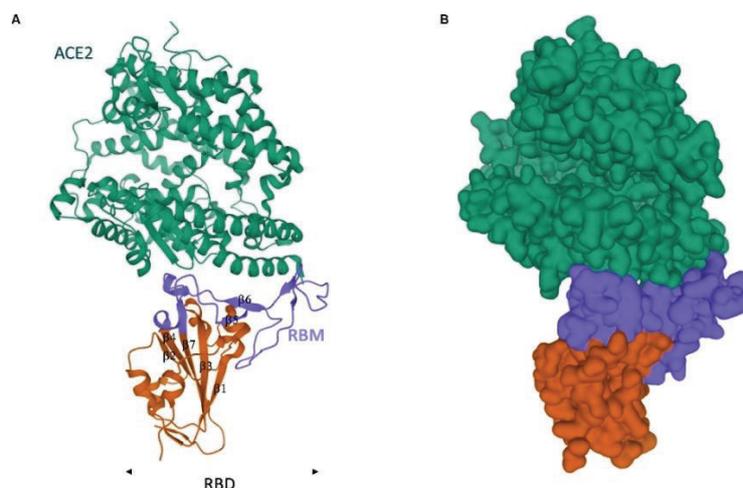
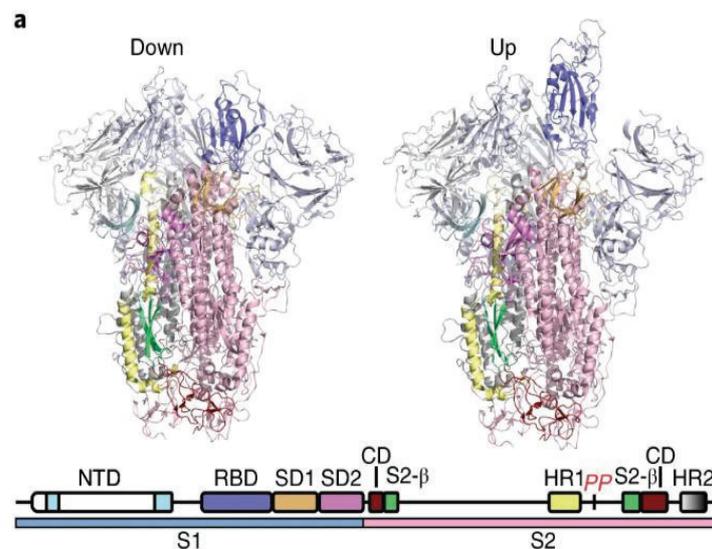


Figura 4: Estructura cristalina del dominio RBD unido al receptor ACE-2. (A) Representación de la estructura secundaria (B) Representación Gaussiana de la superficie. Imagen extraída de [11].

Dentro de Spike, el dominio RBD puede adoptar dos conformaciones distintas, *up* o *down*, lo que refleja la alta proporción de regiones flexibles que posee el dominio (**Figura 5**). En la conformación cerrada o '*down*', el dominio se posiciona sobre la parte apical de S2, ocultando el motivo RBM y, por lo tanto, impidiendo la interacción RBD:ACE-2. En la conformación abierta, o '*up*', en cambio, RBD sufre un cambio conformacional bisagra que expone los residuos del motivo RBM, facilitando la interacción con el receptor humano. Dado que Spike es un trímero, existe una estequiometría determinada por un equilibrio entre los distintos estados conformacionales de RBD [12].



*Figura 5: Estructuras de la proteína S mostrando al dominio RBD en su conformación Down y Up. Cada dominio es representado de acuerdo al código de colores especificado en la estructura genómica debajo de las estructuras. Imagen extraída de [12].*

La interacción de RBD con ACE-2 involucra 16 residuos en RBD y 20 residuos en ACE-2, que interactúan principalmente mediante enlaces de hidrógeno y puentes salinos [13] (**Figura 6**). Diversos estudios *in vitro*, como el de resonancia de plasmón superficial (SPR) o de interferometría, mostraron que esta interacción presenta una afinidad muy importante, en el orden de 1-100 nM. Esta variabilidad en el rango de afinidades es atribuible a las distintas secuencias de RBD empleadas para realizar las mediciones, como así también a las formas de inmovilización necesarias para las técnicas biofísicas mencionadas. En cualquier caso, se encontró que la afinidad del dominio RBD del virus SARS-CoV-2 por ACE-2 es de 4 a 10 veces mayor que la de su homólogo en SARS-CoV-1, algo que también se puso de manifiesto en ensayos en células [11] [14]. Paradójicamente, la afinidad de la proteína S completa del SARS-CoV-2 por ACE-2 mostró ser menor que la proteína homóloga en SARS-CoV-1. Esto muestra que, a pesar de que RBD es más afín por ACE-2, en el contexto de la proteína completa esta afinidad se enmascara producto de las transiciones conformacionales entre el estado *down* y *up*, lo que

le facilita al virus una estrategia de escape al sistema inmunitario. Esto refleja las sofisticadas estrategias evolutivas desarrolladas por el virus SARS-CoV-2, que han permitido, al menos en parte, la tan alta transmisibilidad del mismo: una mayor afinidad de RBD por ACE-2 y, simultáneamente, un sistema de escape a la inmunidad del hospedador [15].

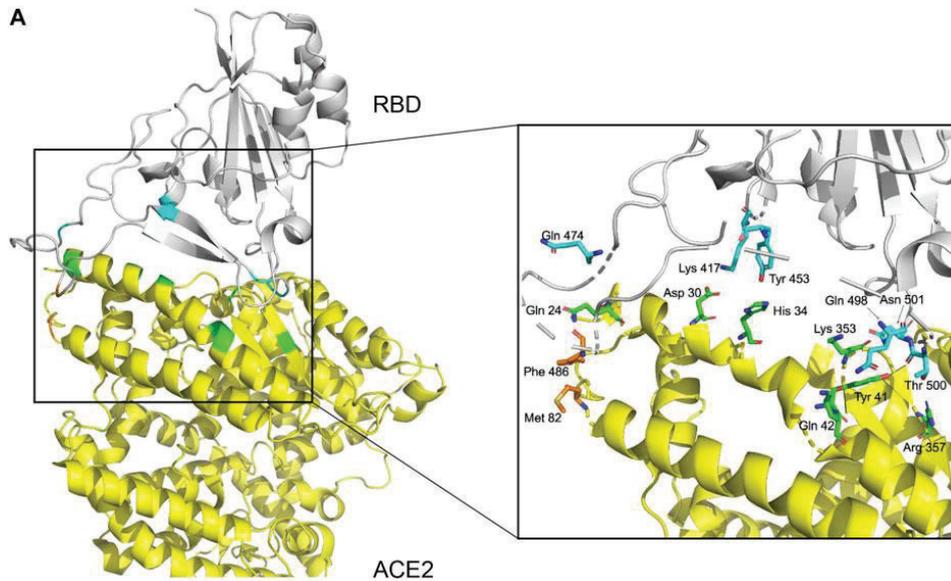


Figura 6: Estructura del complejo RBD-ACE2 en donde se resaltan los residuos implicados en la interacción. Imágenes generadas basadas en la estructura PBD 6MOJ. Extraída de [16]

Como 'llave de entrada' del virus a las células humanas, RBD es uno de los componentes más importantes dentro de la inmunidad ante la infección. Si bien es cierto que es posible encontrar anticuerpos dirigidos contra la proteína N, la proteína Spike es el principal *target* de los anticuerpos neutralizantes [17] [18]. Los **anticuerpos neutralizantes** (NAbs) son aquellos anticuerpos que se unen a estructuras del patógeno interfiriendo con la capacidad de éste de interactuar con los receptores celulares provocando así un obstáculo estérico que impide la infección [19]. De todos los anticuerpos neutralizantes, más de un 90% está dirigido contra el dominio RBD [17] y persisten durante un largo período de tiempo [20]. En línea con esto, la importancia de RBD también se pone de manifiesto en el hecho de que diversas mutaciones que han emergido en las variantes virales de preocupación epidemiológica (VOC, por *variants of concern*) presenten mutaciones localizadas en la región de RBD que interactúa con ACE-2, o bien en sitios alostéricos que aumentan la afinidad de la interacción y/o permiten el escape del sistema inmune [21]. Por ejemplo, la variante B.1.1.7 (conocida originalmente como variante *inglesa*) posee tres deleciones y siete mutaciones puntuales que incrementan la transmisibilidad de la enfermedad entre un 43 a un 90%. Específicamente, la mutación D614G está localizada en

un sitio alostérico que estabiliza la conformación *up* de RBD en Spike y la mutación N501Y aumenta la afinidad de forma directa dado que la tirosina que aparece en esta posición interactúa fuertemente (por fuerzas de stacking) con la tirosina Y41 presente en ACE-2 como se puede ver en la **Figura 7**. Otras mutaciones, como la E484K presente en la variante P.1 (20J/501Y.V3), llaman la atención por prevenir la unión de ciertos anticuerpos neutralizantes y por lo tanto se las conoce como *mutaciones de escape*.

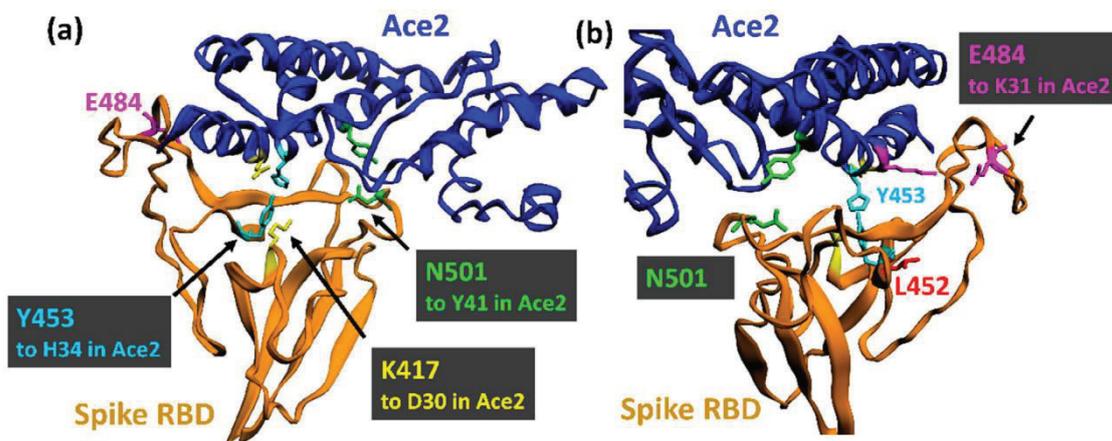


Figura 7: Aminoácidos clave mutados en RBD en algunas variantes de preocupación (VOC). Imagen extraída de [21].

### RBD en la industria biotecnológica

Por las razones explicitadas anteriormente, gran parte del foco biotecnológico para combatir la pandemia está puesto sobre el dominio RBD desde múltiples aristas. En cuanto al diagnóstico, 3 días después de que se dio a conocer el genoma viral (10 de enero de 2022) comenzaron a testearse los casos sospechosos por RT-qPCR. Esta metodología presenta las complicaciones conocidas del alto costo de los reactivos y del equipamiento, como así también el personal calificado que debe manipularlo. Un año más tarde, ya existían más de 250 kits diagnósticos disponibles, muchos de los cuales eran 'Point-of-Care'<sup>2</sup> (POC) [6]. Entre ellos, un gran número detectan o emplean el dominio RBD para la detección del analito de interés. Por ejemplo, en los ensayos serológicos, que son aquellos que se utilizan para la detección de anticuerpos dirigidos

<sup>2</sup> Un ensayo diagnóstico Point-of-Care es aquel que se desarrolla en el lugar donde el paciente lo requiere (o cerca). Esto va en contraposición al diagnóstico tradicional que se suele llevar a cabo en grandes centros diagnósticos centralizados.

contra SARS-CoV-2, usualmente se utiliza al dominio RBD como antígeno para la captura de los anticuerpos.

Por otro lado, por fuera de los antivirales y los agentes inmunomoduladores [22], se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas para enfrentar al SARS-CoV-2, muchas de las cuales involucran al dominio RBD de alguna manera. Por ejemplo, la generación de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra RBD presentan un gran potencial terapéutico por los resultados mostrados [5]. Nuestro grupo ha participado en la producción del antígeno que dio origen al producto terapéutico contra COVID-19, CoviFab® (más conocido como suero hiperinmune anti-SARS CoV-2). En este caso, el grupo ha participado de un proyecto concertado con las empresas biotecnológicas Inmunova y mAbxience, asistiendo en la producción del dominio RBD para su uso como antígeno en la inmunización de equinos [23], a partir de los cuales se obtuvo un suero policlonal con capacidad neutralizante. El producto terapéutico ha sido aprobado en condiciones especiales por ANMAT luego de un ensayo clínico aleatorizado y doble que demostrara mejoría clínica en pacientes con COVID-19 (Disposición de ANMAT 9175/20) [24]. En este marco, uno de los pilares del grupo durante el año 2020 fue la producción de RBD recombinante.

Por último, existen una gran cantidad de estrategias vacunales que ya están aprobadas y están siendo aplicadas alrededor del mundo, y otro número aún mayor (172 candidatas al 30 de septiembre de 2022) en ensayos clínicos. Dentro de estas últimas, las tecnologías varían notablemente, pero la mayoría son de proteína a subunidad [25]. La estrategia más común para la manufactura de estas vacunas es la producción de forma recombinante del antígeno vacunal. Una plétora de estas candidatas utiliza a RBD o a distintos fragmentos de Spike que contienen a RBD. De hecho, entre estas candidatas, se encuentra la vacuna argentina 'ARVAC-Cecilia Grierson', desarrollada por investigadores de la Universidad Nacional de San Martín y CONICET [26].

Todo lo mencionado pone en claro manifiesto la importancia de RBD desde el punto de vista de la biología viral, pero también desde una perspectiva biotecnológica. Por este motivo, actualmente se están produciendo grandes cantidades de RBD de forma recombinante para la manufactura de los productos biotecnológicos mencionados anteriormente. Se han intentado buscar distintas plataformas económicas de expresión para su producción, sobre las que ya hay una gran batería de herramientas genéticas o conocimiento industrial para su escalado. Por ejemplo, se han utilizado levaduras como *P. pastoris* [27], algas [28], plantas [29], gusano de la seda [30], entre otros sistemas. La elección de una plataforma de expresión por sobre la otra dependerá de la aplicación final del bioinsumo y de los recursos disponibles. Una de las

principales consideraciones a tener en cuenta a la hora de elegir una plataforma de expresión no-humana (o humanizada) son los **patrones de glicosilación**. Los patrones de glicosilación varían muy notablemente entre distintos grupos de eucariotas. Por poner un ejemplo, la levadura *P. pastoris* hipermanosila a las proteínas por la presencia de enzimas que modifican el árbol de azúcares final de la proteína de interés. Esto puede traer aparejadas severas complicaciones en relación a las potenciales aplicaciones de RBD o Spike recombinantes puesto que la glicosilación de la proteína viral cumple roles estratégicos en términos de la infección y la respuesta inmune [16]. De hecho, como se puede ver en la **Figura 8**, cada monómero de Spike contiene 22 sitios de glicosilación. Si bien es cierto que los azúcares pueden enmascarar epítopes, también es cierto que suele observarse un alto título de anticuerpos neutralizantes que reconocen epítopes que involucran a dichos glicanos [16].

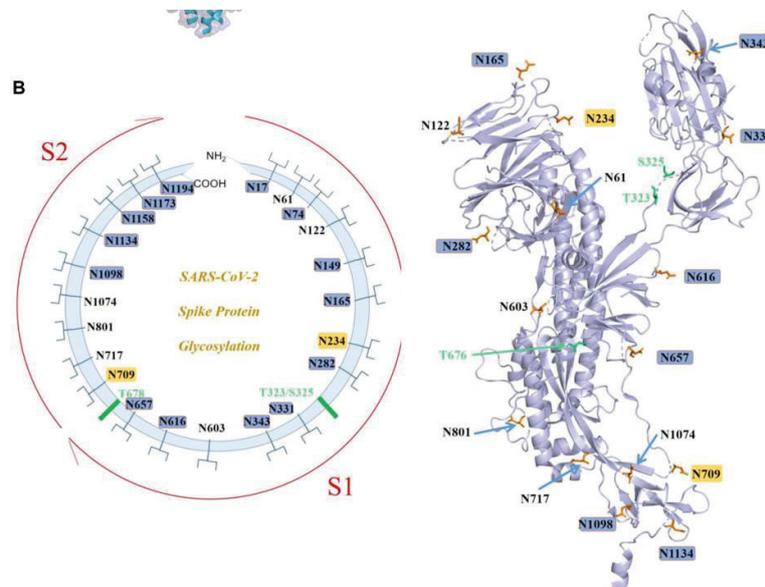


Figura 8: A la izquierda, un diagrama esquemático que muestra los sitios de glicosilación de Spike. A la derecha, una representación espacial de un monómero de Spike con los correspondientes sitios de glicosilación. Imagen extraída de [16].

Por este motivo, dependiendo de la aplicación final del bioinsumo, será más o menos importante imitar el patrón de glicosilación que la proteína presenta en su hospedador humano. En ciertas aplicaciones, resulta importante producir RBD en células humanas o humanizadas, para obtener perfiles de glicosilación lo más parecidos posibles (o iguales) a los que ocurren en el hospedador humano. Sin embargo, es sabido que la producción de proteínas recombinantes en células de mamífero es menos económica que en otros sistemas, por la necesidad de medios de cultivos

costosos, las bajas densidades celulares alcanzadas y los bajos rendimientos de producción de algunas líneas. En este sentido, se ha intentado optimizar el proceso de producción RBD de forma recombinante en células de mamífero para dar respuesta a la creciente demanda de este bioinsumo. Algunas de las estrategias más comunes en dicha optimización involucraron cambios en las temperaturas de incubación (*temp-shift*), los tiempos de cosecha, el uso de distintas herramientas genéticas como promotores y péptidos señal, distintos métodos de purificación y/o de manipulación final de la proteína [31]. En líneas generales, el rendimiento alcanzado ronda los 10-40 mg de proteína por litro de cultivo [32]. Otra de las optimizaciones que se han realizado son adaptaciones de las líneas celulares de mamífero, que comúnmente crecen adheridas al sustrato, a crecer en suspensión. Por ejemplo, la línea celular Expi293F™ es una adaptación de la línea adherente HEK293T a crecer en suspensión. Este cambio en la forma de crecimiento, ha permitido que los cultivos alcancen altas densidades y se obtengan rendimientos de hasta 1 gramo de producto por litro de cultivo en ciertas proteínas [33]. Adicionalmente, el uso de esta línea celular en suspensión por sobre su contraparte adherente, permite prescindir del uso del suero fetal bovino (SFB) en el medio de cultivo, algo que necesitan las células adherentes porque provee al mismo de factores de crecimiento, factores de adhesión y actividad anti-tripsina, que promueven la adherencia celular [34]. A su vez, el suero es fuente de hormonas, lípidos y minerales. Sin embargo, el empleo de SFB presenta una serie importante de desventajas, especialmente cuando se intenta producir proteínas recombinantes. En primer lugar, existe una variabilidad fisiológica asociada al uso de SFB dada la incompleta caracterización de los mecanismos de acción de todos los constituyentes del mismo que, a su vez, varían en su concentración de lote a lote, lo que exige exhaustivos controles de calidad y limita la estandarización. Por otro lado, el SFB complica la purificación de un producto a partir del cultivo celular e incluso puede limitar su aprobación para uso farmacéutico. Por último, el uso de SFB aumenta significativamente los costos de producción de manera que limita la escalabilidad del bioproceso en cuestión [34]. Por estas razones, en la industria biotecnológica, las líneas celulares de mamífero que crecen en suspensión son preferidas.

### *Cuantificación de proteínas recombinantes en muestras de bioprocesos*

Cualquiera sea la plataforma en la que se decida producir RBD de forma recombinante, en todos los casos es necesaria la trazabilidad de la producción y adecuados controles de calidad. Entre distintos parámetros que deben determinarse se encuentra la cuantificación precisa de la proteína de interés. Para ello, existen distintos métodos que permiten determinar la concentración de una proteína en una muestra incógnita. La elección de un método sobre otro

depende de diversos factores entre los que se encuentran la pureza de la proteína de interés, la presencia de sustancias interferentes, el límite de detección de la técnica y la precisión necesaria de la medición. En la **Tabla 1** se resumen los distintos métodos de cuantificación disponibles y sus ventajas y limitaciones.

*Tabla 1: Características de los distintos métodos de cuantificación de proteínas en una muestra. Información extraída de [35] [36] [37].*

Técnica	Límite de detección	Ventajas	Desventajas
<b>Análisis cuantitativo de aminoácidos por HPLC</b>	50 pmol empleando Ninhidrina para derivatizar	Muy empleado Reproducible	Altos tiempos Optimización en la hidrólisis y derivatización <i>No sirve para muestras complejas</i>
<b>Análisis cuantitativo de aminoácidos por MS</b>	10 pmol	Menor tiempo de operación	Muy costoso <i>No sirve para muestras complejas</i>
<b>Biuret</b>	1-10 µg/ml	Bajos costos Fácil realización Muy extendidos	Presencia de agentes interferentes. <i>No sirven para muestras complejas</i>
<b>Lowry</b>	0.1-1 µg/ml		
<b>BCA</b>	0.1-1 µg/ml		
<b>Bradford</b>	0.05-0.5 µg/ml		
<b>A280</b>	20-3000	Poco susceptible a interferencias	Depende de la composición de la proteína Alto límite de detección <i>No sirve para muestras complejas</i>
<b>A205</b>	1-100 µg/ml	No depende de la composición de la proteína	Muy susceptible a interferencias <i>No sirve para muestras complejas</i>
<b>SDS-PAGE</b>	1 mg/ml	Fácil de realizar Da cuenta de la pureza de la muestra Puede servir para muestras complejas si identifica la banda de interés	Muy impreciso y muy alto límite de detección.
<b>HPLC (si existe una columna adecuada)</b>	Depende de la columna y la proteína de interés. Alrededor de 0.25 mg/ml	Fácil de realizar. Es útil para la cuantificación de proteínas en muestras complejas con alta precisión	Elevados costos del equipamiento.

Como se puede ver, la mayoría de los métodos exigen que la proteína se encuentre *purificada* por la naturaleza de los parámetros que se miden para su cuantificación. Por ejemplo, en los métodos colorimétricos (como Lowry, Bradford, BCA o Biuret) los agentes cromogénicos reaccionan con grupos funcionales presentes en todas las proteínas para dar productos coloreados [36]. Por lo tanto, si hay otras proteínas (o sustancias interferentes) presentes en la muestra, los reactivos reaccionarían con ellas también generando imprecisiones en la cuantificación. Lo mismo ocurre con los métodos espectroscópicos que emplean las propiedades de absorción de luz de las proteínas a determinadas longitudes de onda [36]. Todas las proteínas absorben luz (siendo 280 nm la longitud de onda más ampliamente utilizada) y dicha absorbancia se relaciona con la concentración de la muestra según la ecuación de Lambert-Beer:

$$A_{280} = \varepsilon_{280} \cdot b \cdot C \quad (1)$$

En donde  $A_{280}$  es la absorbancia de la muestra a 280 nm,  $\varepsilon$  el coeficiente de absorptividad molar a 280 nm,  $b$  el paso óptico y  $c$  la concentración de la proteína de interés. Como el coeficiente de absorptividad molar es específico para cada proteína, la muestra debe contenerla en alto grado de pureza. A su vez, a 280 nm los ácidos nucleicos también absorben y por lo tanto interfieren con la cuantificación [36].

Por esta razón, para la cuantificación de muestras de bioprocesos que son naturalmente complejas, es necesario el empleo de otras metodologías. Una de las más tradicionales es la cuantificación por **densitometría** empleando geles **SDS-PAGE y tinción por Coomassie**, en el caso de que sea posible identificar la banda de la proteína de interés en el gel de poliacrilamida. Este método presenta una alta imprecisión y un alto límite de detección dadas las variables que se presentan en el sembrado del gel, la corrida de la muestra, etc [37]. Además, la presencia en la muestra de proteínas con peso molecular similar al de la proteína de interés, puede traer imprecisiones en la cuantificación. Adicionalmente, se ha visto que el Coomassie Blue interacciona de forma diferencial en función de qué proteína se quiera cuantificar [38]. Otra de las alternativas para la cuantificación de proteínas en muestras complejas es el empleo de **cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**, en caso de existir las columnas cuyas fases estacionarias resistan las condiciones de alta presión necesarias para la alta resolución del método analítico. Para el caso de las proteínas con tag de histidina (como el caso de RBD recombinante empleada en este trabajo), el método cromatográfico que más se utiliza para su separación es el de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Este método se basa en el hecho de que las proteínas con tag de histidinas tienen una alta afinidad por ciertos metales divalentes, como el  $\text{Ni}^{2+}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$ , que al ser inmovilizados a la fase estacionaria utilizando ligandos

quelantes, son capaces de separar estas proteínas del resto de la muestra compleja [39]. Sin embargo, las fases estacionarias típicas en la cromatografía IMAC están basadas en matrices como la agarosa, el dextrano y la sefarosa que, si bien son efectivas para ciertas aplicaciones más preparativas, no son compatibles con las presiones empleadas en los equipos de HPLC y, por lo tanto, no pueden ser empleadas para cuantificar precisamente proteínas con tag de histidinas en muestras complejas. Recientemente, haciendo uso de nanotecnología, se han desarrollado columnas IMAC analíticas resistentes a las altas presiones empleadas en HPLC [40] que ya están disponibles comercialmente. Sin embargo, cabe aclarar que tanto los equipos HPLC como estas columnas analíticas presentan unos costos sustancialmente elevados [41].

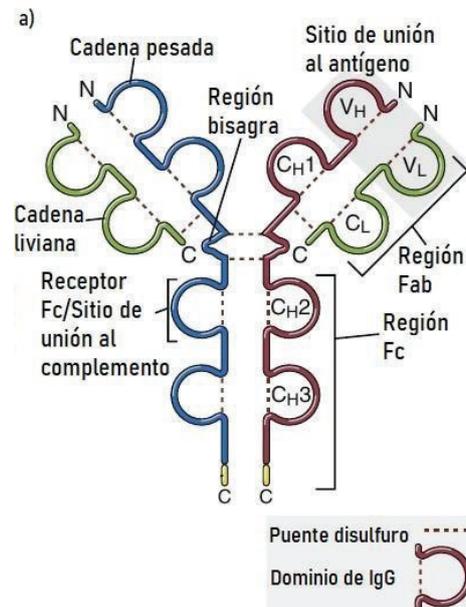
### *Anticuerpos y Anticuerpos Monoclonales*

Los anticuerpos han ganado una importancia muy grande en química bioanalítica dada la especificidad en el reconocimiento de los antígenos, lo que dota de la capacidad de determinar proteínas dentro de muestras complejas, a diferencia de lo que ocurre en algunos de los métodos descritos anteriormente [42].

Los **anticuerpos**, también denominados inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas pertenecientes al sistema inmune de los vertebrados. Los mismos son producidos por los linfocitos B frente a la exposición a estructuras extrañas denominadas **antígenos** y pueden encontrarse presentes en dos formas: unidos a la membrana de los linfocitos B como receptores celulares (BCR), o en su forma secretada. Los antígenos estimulan la producción de anticuerpos mediante distintos mecanismos inmunológicos complejos que comienzan por el reconocimiento del antígeno por parte de linfocitos B vírgenes y que incluyen la colaboración de otros tipos celulares como los linfocitos T [19].

Los anticuerpos están conformados por 4 cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro. Dos de estas cadenas se denominan cadenas livianas (L) mientras que las dos restantes se denominan cadenas pesadas (H), llamadas así por sus pesos moleculares correspondientes. Las dos cadenas livianas y pesadas están compuestas por una serie de dominios repetidos homólogos estructurales de unos 110 aminoácidos cada uno. Ambas cadenas constan de regiones amino-terminales variables, implicadas en el reconocimiento del antígeno, y regiones carboxilo terminales constantes, que ayudan a mediar algunas de las funciones efectoras de los anticuerpos. Además, según el tipo de región constante de la cadena pesada que presenten los anticuerpos, los mismos pueden dividirse en los isotipos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cada isotipo presenta una funcionalidad diferente, ya que pueden ser reconocidos por diferentes receptores

y pueden, por lo tanto, desencadenar diferentes respuestas inmunológicas [19]. En la **Figura 9** se puede ver un esquema de la estructura de una IgG. Como se puede ver en el esquema, el sitio de unión al antígeno se forma por la yuxtaposición de los dominios variables  $V_H$  y  $V_L$ .



*Figura 9: Diagrama esquemático de la estructura de una molécula de IgG secretada. Imagen adaptada de [19].*

En particular, dentro de las regiones variables de ambas cadenas existen tres secuencias cortas (de unos 10 aminoácidos) llamadas segmentos hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las tres regiones hipervariables del dominio  $V_L$  y las tres regiones hipervariables del dominio  $V_H$  constituyen la superficie de interacción al antígeno. Las secuencias CDR, producto de complejos mecanismos genéticos, son las más variables dentro de la estructura de un anticuerpo, lo que facilita la existencia de un repertorio enorme de anticuerpos capaz de reconocer esencialmente cualquier estructura foránea (**Figura 10**) [43].

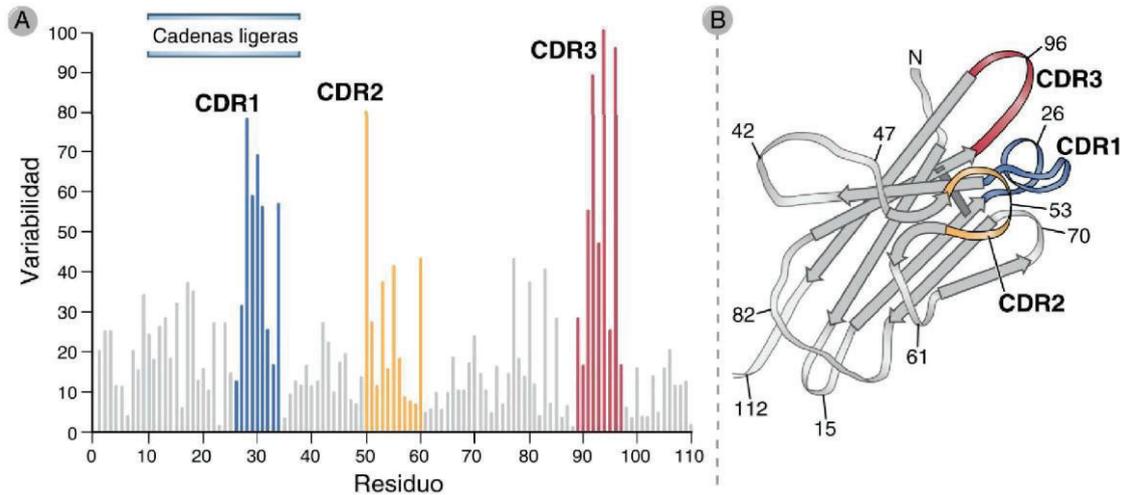


Figura 10: **Regiones hipervariables en las moléculas de anticuerpo.** El análisis de variabilidad (A) muestra que los aminoácidos más variables se agrupan en tres regiones (CDR1, CDR2 y CDR3). Estas regiones (B), en conjunto con las tres regiones hipervariables de la cadena pesada, son las que generan la zona de unión al antígeno. Imagen extraída de [19].

La porción del antígeno que es reconocida por un anticuerpo se conoce como **epitope** o determinante antigénico. En el caso de biomoléculas que tienen estructuras de orden superior, como las proteínas, los epitopes pueden tener distinta naturaleza en función de si el reconocimiento del mismo se da en la proteína plegada únicamente (**epitope discontinuo**) o si el reconocimiento se da tanto sobre la secuencia lineal de aminoácidos (**epitope continuo**) (Figura 11).

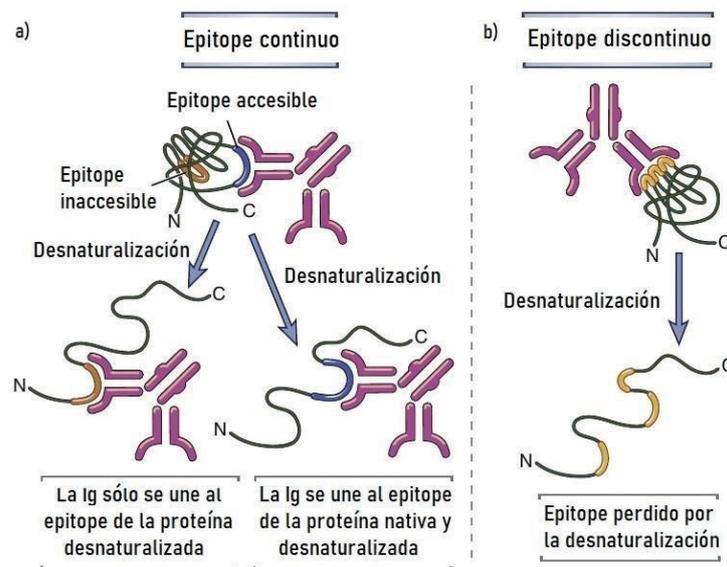
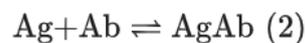


Figura 11: **Naturaleza de los determinantes antigénicos.** Los epitopes pueden ser continuos si el reconocimiento por parte del anticuerpo involucra la secuencia lineal de aminoácidos (A) o discontinuos, si el reconocimiento implica estructuras de orden superior que sólo están presentes cuando la proteína está plegada (B). Imagen adaptada de [19].

La información del sitio de reconocimiento de los anticuerpos es de suma importancia porque puede proveer información mecanística de la interacción, pero, además, puede dar idea de las potenciales aplicaciones biotecnológicas del anticuerpo. Por lo tanto, se han desarrollado una batería de metodologías para encontrar los epitopes de los anticuerpos, en lo que se denomina **mapeo epitópico**. Estas metodologías incluyen diversos abordajes como los basados en péptidos, los de biología estructural, la mutagénesis y distintos abordajes *in silico* de predicción [44].

El reconocimiento del antígeno por los anticuerpos implica interacciones no covalentes y, por lo tanto, es una unión reversible. La fuerza de estas interacciones genera la **afinidad** del anticuerpo por el antígeno en cuestión. La afinidad de un anticuerpo es un parámetro muy importante a determinar en términos de su caracterización, sobre todo cuando se trata de un inmunoensayo, dado que la afinidad tendrá una íntima relación con la capacidad del mismo de detectar adecuadamente el analito. Por ejemplo, en un ensayo tipo ELISA es necesario que el reconocimiento sea con alta afinidad de forma tal que se puedan detectar cantidades pequeñas del antígeno y que la interacción antígeno-anticuerpo resista los pasos de los lavados (Ver más adelante) [45]. En general, cuando se habla de la afinidad de la interacción antígeno-anticuerpo se hace referencia a la **constante de disociación  $K_D$**  en el equilibrio químico de la reacción reversible:

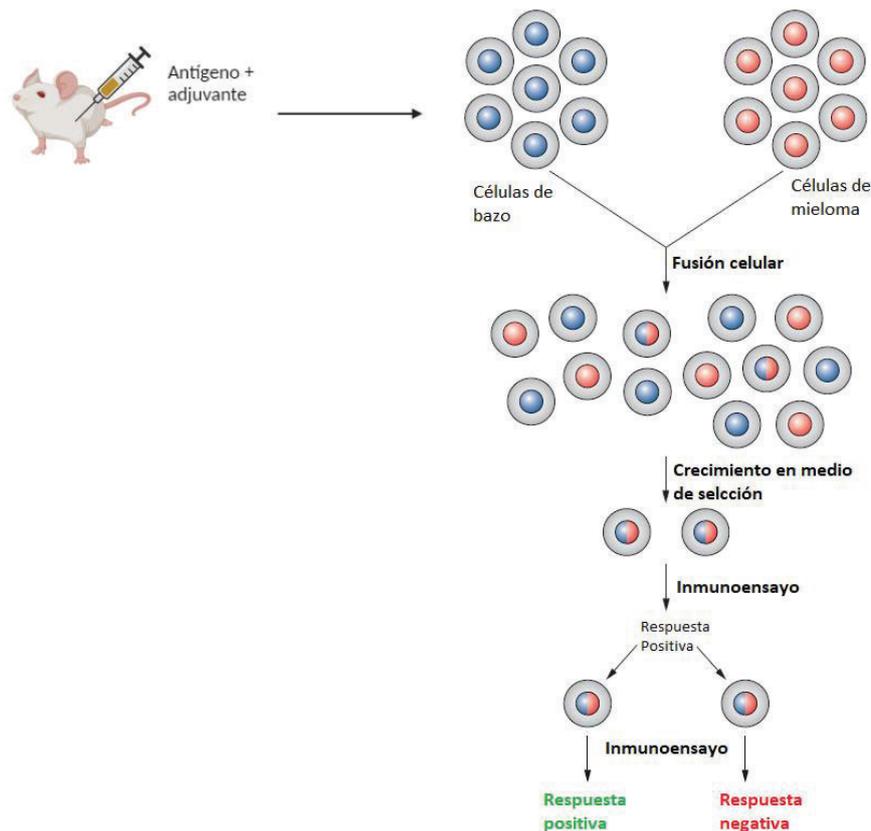


$$K_A = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]} = \frac{1}{K_D} \quad (3)$$

Se han desarrollado distintas estrategias para el cálculo de las  $K_D$ . Una de las estrategias más ampliamente utilizadas hace uso del fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (RPS), metodología disponible en una serie de equipos Biacore®(GE Healthcare).

El uso de los anticuerpos en los inmunoensayos fue disparado producto de la tecnología desarrollada por Georges Kohler y César Milstein en 1975 para generar anticuerpos monoclonales. Hasta aquel momento, el uso de anticuerpos policlonales en inmunoensayos ya había sido empleado, pero limitaba su aplicación la variabilidad entre las distintas preparaciones [46]. Un **anticuerpo monoclonal (mAb)** es una mezcla pura de moléculas de anticuerpo idéntica, con la misma especificidad. El método desarrollado por Milstein en 1975 se basa en la fusión celular de linfocitos B procedentes de un animal inmunizado, con una línea celular inmortal de

mieloma y el cultivo en condiciones en las que únicamente puedan sobrevivir los eventos de fusión de ambos tipos celulares. Una vez obtenidas estas fusiones celulares, llamadas hibridomas, se realizan chequeos de la reactividad (por distintos inmunoensayos) y luego protocolos de cultivo y clonación para obtener los cultivos monoclonales productores de anticuerpos que luego pueden ser purificados por distintas técnicas. En la **Figura 12** se muestra un esquema genérico de obtención de mAbs.



*Figura 12: Proceso esquemático de obtención de mAbs por la tecnología de hibridomas. Adaptada a partir de [46] y empleando BioRender®*

Como se puede ver en la **Figura 12**, durante las rondas de inmunización de los ratones para obtener los mAbs, es posible emplear adyuvantes. Un **adyuvante** es una sustancia que se añade para estimular e incrementar la magnitud y la durabilidad de la respuesta inmune dirigida contra el antígeno en cuestión. Si bien los mecanismos de acción de todos los adyuvantes disponibles no están completamente dilucidados, se ha visto que muchos de ellos actúan estimulando vías de la respuesta inmune innata, en particular accionando sobre los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) [47]. Es sabido que, dada la naturaleza fisicoquímica de los adyuvantes, es posible que estos alteren la estructura tanto secundaria como terciaria de los antígenos modificando el perfil de la respuesta humoral dirigida contra los mismos [48] [49]. Por ejemplo, las emulsiones de agua en aceite (como el adyuvante de Freund), que son muy

empleadas en la generación de mAbs en ratones, se ha visto por distintos estudios, que alteran la estructura tanto secundaria como terciaria del antígeno, orientando el reconocimiento de los anticuerpos hacia epítopes continuos de la proteína [49]. Otros adyuvantes, como el Alum (sales de fosfatos e hidróxidos de aluminio trivalente), han mostrado ser para ciertos antígenos mucho más amenos con su estructura de orden superior. Por ejemplo, en un estudio en el que se evaluó la estructura de la proteína OVA por dicrosimo circular al formularse con Alum, se encontró que la proteína no perdió su estructura de forma considerable [50].

### *Ensayo de ELISA. ELISA tipo Sándwich*

Existe una plétora de aplicaciones de los mAbs en clínica e investigación. Por ejemplo, se los puede utilizar para tratamientos, como marcadores fenotípicos o en distintos inmunoensayos. Dentro de los inmunoensayos que utilizan anticuerpos, los ensayos tipo **ELISA** (por *enzyme-linked immunosorbent assay* en inglés) tienen un rol preponderante. El ELISA fue desarrollado en 1971 por Engvall y Perlmann y proveyó, tanto a la academia como a la industria, de una poderosa herramienta para el análisis y cuantificación de proteínas en muestras complejas, haciendo uso de microplacas y anticuerpos específicos. Para la detección del analito, el mismo debe ser inmovilizado, ya sea de forma directa por adsorción a la fase sólida (**Figura 13** – Ensayo Directo o Indirecto) o por medio de la interacción con un anticuerpo específico inmovilizado en la placa (**Figura 13** – Ensayo Sándwich o captura) [51]. Luego de esta inmovilización es necesaria la detección del analito haciendo uso de una molécula, generalmente un anticuerpo conjugado a una enzima que cataliza la conversión de un sustrato incoloro a un producto coloreado cuya absorbancia es luego medida mediante un espectrofotómetro. Entre los distintos pasos del ensayo los lavados aseguran que únicamente las uniones específicas (y con alta afinidad) se mantengan para la detección final.

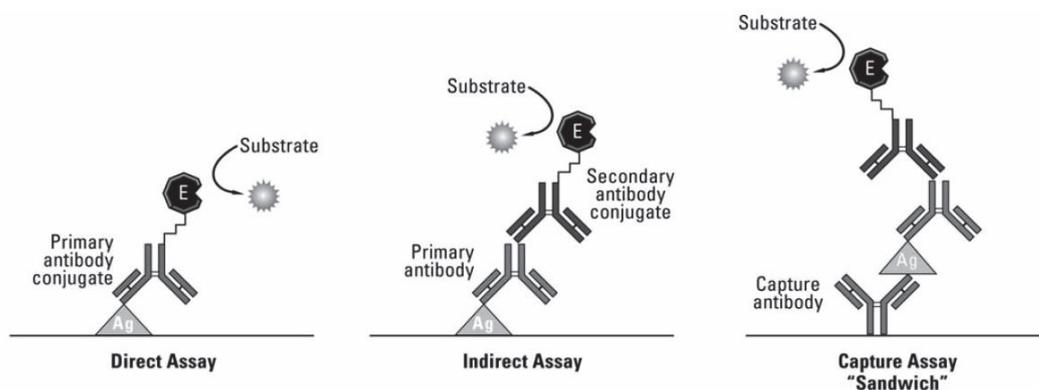


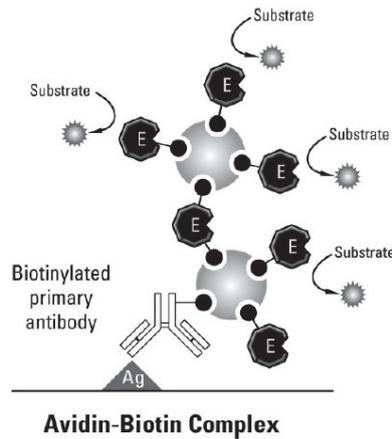
Figura 13: Diagrama de los ensayos ELISA más utilizados. Imagen extraída de [51].

En particular, los ensayos **ELISA tipo Sandwich** han ganado un peso importante en la determinación de muestras complejas porque permiten inmovilizar en forma específica al analito de interés, aún este se encuentre inmerso en una mezcla compleja de proteínas. Para ello, es requerido un **anticuerpo de captura** que se inmoviliza en la fase sólida y que reconoce al analito de interés con alta afinidad. Además, es necesario un **anticuerpo de detección** que debe reconocer a la proteína en un epítipo distinto al del anticuerpo de captura. Esto supone un nivel de complejidad adicional respecto de los ELISA de tipo directo o indirecto, ya que no sólo deben generarse dos anticuerpos en lugar de uno, sino que ambos deben ser validados para trabajar en conjunto y no competir o interferir en su reconocimiento<sup>3</sup>. Además, al tener más reactivos y pasos, los ensayos tipo Sándwich suelen requerir optimizaciones más tediosas que los ELISAS tradicionales. Sin embargo, la relación señal:ruido (S:R) es notablemente más alta [51].

En cualquier caso, el anticuerpo de detección debe conjugarse a un sistema de detección, ya sea una enzima, un fluoróforo o un sistema de amplificación de la señal. Los **sistemas de amplificación** permiten lograr mediciones más sensibles. Uno de los más conocidos es el sistema de la biotina, que hace uso de una de las interacciones más fuertes de la naturaleza: la de la biotina con la estreptavidina ( $K_d=10^{-14}$  M [52]). La biotina es una molécula pequeña (244 g/mol) que puede conjugarse fácilmente a los anticuerpos a través de los grupos aminos de las Lisinas. Este sistema puede utilizarse como se ilustra en la **Figura 14**, en donde el anticuerpo de detección es conjugado a moléculas de biotina que luego son detectadas por la estreptavidina conjugada a una enzima como la peroxidasa de rábano picante (HRP) o la fosfatasa alcalina (AP). La amplificación de la señal en este caso se da a dos niveles: en primer lugar, hay varias moléculas de biotina conjugadas por molécula de anticuerpo y, en segundo lugar, por la naturaleza de la estreptavidina, se conjuga más de una enzima por molécula de estreptavidina, amplificando la señal también en este nivel permitiendo mediciones verdaderamente sensibles [51].

---

<sup>3</sup> Hay excepciones a esta regla general: Por ejemplo, si el analito posee epitopes repetidos, es posible que sea capturado y detectado con el mismo mAb.



*Figura 14: Esquema del sistema de amplificación de biotina. El anticuerpo de detección es conjugado a moléculas de biotina, que luego son detectadas por estrepavidina unida a una enzima tipo HRP.  
Extraída de [51].*

Es importante destacar que no todos los anticuerpos monoclonales específicos para el analito funcionan en un ELISA. La reacción antígeno-anticuerpo es una reacción cuya afinidad está determinada por la complementariedad estereoquímica entre ambos componentes, así como también por una gran serie de interacciones no covalentes. Por lo tanto, la adsorción del anticuerpo a la fase sólida puede causar alteraciones en la estructura tridimensional del paratope que generen que ya no se pueda unir al analito o que lo haga con menor afinidad [42] [53]. Por otro lado, igual de importante es que el anticuerpo no debe tener reactividad cruzada con componentes de la muestra compleja o del buffer de bloqueo. De otra manera, la detección será inespecífica. Por último, como ya se mencionó, es menester que, en el caso del ELISA Sándwich, ambos anticuerpos reconozcan distintos epítopes del analito (o bien el mismo se encuentre repetido) [51]. Estas complicaciones ponen en evidencia que, para el óptimo desarrollo de un ELISA Sándwich de cuantificación será necesaria la obtención y caracterización de varios anticuerpos monoclonales, de manera de poder encontrar un par de anticuerpos para captura y detección que funcionen bien en conjunto.

Una vez que se tienen los anticuerpos purificados, hay que determinar qué par de anticuerpos funcionan mejor para un ensayo de cuantificación ELISA tipo Sándwich. Al tener seleccionados los dos anticuerpos, es necesario optimizar las distintas condiciones del ELISA para tener una ventana de detección específica (**Figura 15** [42]).

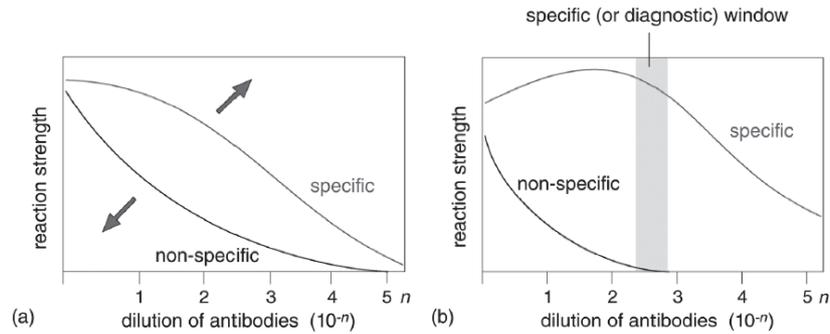


Figura 15: Optimización del ELISA para obtener la ventana de detección específica. Extraída de [42].

Finalmente, como en todo método analítico, el ensayo debe ser validado y para ello, diversos atributos analíticos deben ser determinados. Acorde a lo establecido por la Farmacopea Argentina [54], en función de las características de cada método analítico se establece cuáles de estos atributos son requeridos o no. Por ejemplo, en la Categoría I se engloban los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de los principios activos en productos farmacéuticos. En esta categoría se exigen atributos como la exactitud, la precisión, la especificidad y la linealidad [54]. En la **Tabla 2** se enlistan distintos atributos que pueden ser requeridos, con sus respectivas definiciones y formas de calcularlos.

Tabla 2: Parámetros necesarios para la validación de un método de cuantificación por ELISA. Información extraída de [54] y [55].

Parámetro	Definición	Cálculo
<b>Especificidad</b>	Capacidad del método de distinguir al analito de los demás componentes dentro de una muestra compleja	Una forma de testear la especificidad es medir concentraciones conocidas del analito en distintas muestras complejas a las que se les puede agregar impurezas o sustancias estructuralmente relacionadas (Ensayo <i>spike-and-recovery</i> ). Valores aceptables hasta 25% de diferencia respecto al valor nominal
<b>Linealidad</b>	Capacidad del método de producir una señal directamente proporcional al analito de interés dentro de un rango de trabajo	Se realiza una regresión lineal (método de mínimos cuadrados) sobre una curva de calibración para calcular la ecuación lineal que mejor describe a la curva: $y = mx + b \quad (4)$ A partir de esto se puede calcular el rango y el límite de cuantificación superior e inferior

<p><b>Sensibilidad</b></p>	<p>Hace referencia a la mínima concentración de analito que puede ser distinguida del background.</p>	<p>En el caso de ajustes lineales se puede calcular de la siguiente manera:</p> $LD = \frac{3SD(b)}{m} \quad (5)$ <p>En donde SD(b) es el desvío estándar del blanco y m la pendiente de la curva lineal</p>
<p><b>Exactitud</b></p>	<p>Hace referencia a la diferencia entre la concentración del analito calculada por el método y la concentración real o nominal del mismo</p>	<p>La forma más común de calcularla consiste en añadir al analito en concentración conocida y medirlo con el método para calcular el error relativo:</p> $\delta = \frac{\Delta X}{\mu} \quad (6)$ <p>En donde <math>\Delta X</math> es el error absoluto de la medición y <math>\mu</math> es el valor nominal</p>
<p><b>Precisión</b></p>	<p>Describe la reproducibilidad del método tanto intraensayo (repetitibilidad) como interensayo (reproducibilidad)</p>	<p>Los parámetros que describen la precisión del método son el desvío estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV)</p> $SD = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{N}} \quad (7)$ $CV = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (8)$

## Hipótesis

En la actualidad, existe un número limitado de ensayos de cuantificación del dominio RBD mediante ELISA. Además, hasta donde conocemos, ninguno de ellos es de fabricación nacional lo que complica su accesibilidad tanto desde el lado económico como del de los largos tiempos de espera de importación. Adicionalmente, en el país se están produciendo grandes cantidades de RBD de forma recombinante para reactivos de diagnóstico, terapias y vacunas. Esto, sumado a la vasta experiencia del grupo en materia de anticuerpos monoclonales y bioquímica de proteínas, nos permite suponer que seremos capaces de desarrollar rápida y efectivamente un ELISA de cuantificación del dominio RBD de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2, y que dicho ensayo tendrá un mercado importante para su comercialización y que impactará positivamente en la industria biotecnológica nacional.

## Objetivo general

Desarrollar un ELISA Sándwich de cuantificación del dominio RBD de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2 a partir de muestras complejas, empleadas comúnmente en la industria biotecnológica.

## Objetivos específicos

1. Producir y purificar las proteínas recombinantes necesarias para el desarrollo del inmunoensayo.
2. Desarrollar un método de screening eficiente en la evaluación de la reactividad IgG dirigida contra epitopes discontinuos de RBD
3. Realizar un plan de inmunización de ratones empleando RBD recombinante en conjunto con un adyuvante que permita montar una respuesta humoral potente orientada contra epitopes discontinuos de RBD.
4. Realizar la fusión celular, clonado, expansión y congelamiento de las líneas productoras de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopes discontinuos de RBD.
5. Caracterizar parcialmente a los mAbs generados.
6. Poner a punto el ensayo de cuantificación final
7. Validar la capacidad del ensayo para cuantificar RBD dentro de matrices complejas, típicas de distintos bioprocesos.

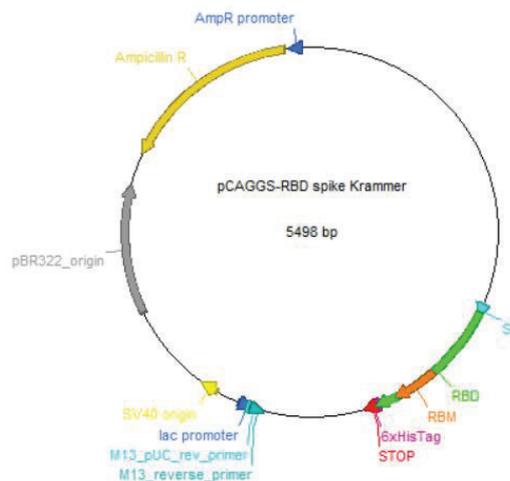
## Materiales y Métodos

### *Producción y purificación de las proteínas recombinantes en células de mamífero*

#### *Secuencias de los plásmidos utilizados*

##### Secuencia RBD (Wuhan)

La secuencia del dominio RBD (aminoácidos 319-541) fue provista gentilmente por el Prof. Florian Krammer en el plásmido pCAGGS [56], un plásmido de expresión para células de mamífero. El plásmido contiene la región codificante del dominio RBD (residuos 319-514 de Spike) río abajo del péptido señal de secreción de la proteína Spike (residuos 1-14) y un tag de 6 histinas en el extremo C-terminal para su purificación por cromatografía de afinidad a quelatos metálicos inmovilizados (IMAC). En la **Figura 16** se puede ver el mapa del plásmido, con sus respectivos sitios de restricción y la resistencias al antibiótico Ampicilina.



*Figura 16: Mapa del plásmido de expresión del dominio RBD para células de mamífero [56].*

La secuencia de la región codificante del plásmido se muestra a continuación, en la cual se resaltan el péptido señal (en verde), la secuencia de RBD (en negro), el tag de histidinas (en celeste) y el codón stop (amarillo).

>Secuencia de RBD en el plásmido pCAGGS

```

ATGTTTCGTTTCTGGTGTCTGCTGCCTCTGGTGTCCAGCCAGCGGGTGCAGCCACCGAATCCATCGTGCGGTTCCTCAATATCACCA
ATCTGTGCCCTTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAGATTTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGC
CGACTACTCCGTGTGTACAACCTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGTACGGCGTGTCCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTC
ACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGAGATGAAGTGCAGGAGATTGCCCTGGACAGACAGCAAGATCGCCGACTACA
ACTACAAGCTGCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTA
CCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGT

```

AACGGCGTGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCCTGACAGTCCACGGCTTTCAGCCACAAATGGCGTGGGCTATCAGCCCTACAGAG  
TGGTGGTGTGAGCTTGAAGTGTGCATGCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAATGCGT  
GAACCTCCACCATCACCATCACCATTGA

Secuencia ACE-2 (ectodominio)

La construcción utilizada para expresar el dominio extracelular del receptor ACE-2 comprende los residuos 1 – 740 del gen ACE2 (Gene ID: 59272), y un tag de 6 histidinas en su extremo C-terminal. El péptido señal corresponde a los residuos 1-17 del gen de ACE-2. El gen fue obtenido de forma sintética a través de la empresa Genscript® y se encuentra clonado en el plásmido pCDNA3.1 Hygro+. En la **Figura 17** se puede ver el mapa del plásmido con sus correspondientes sitios de restricción y las resistencias a antibióticos (ampicilina e higromicina). La resistencia a higromicina permite la generación de líneas estables en células animales.

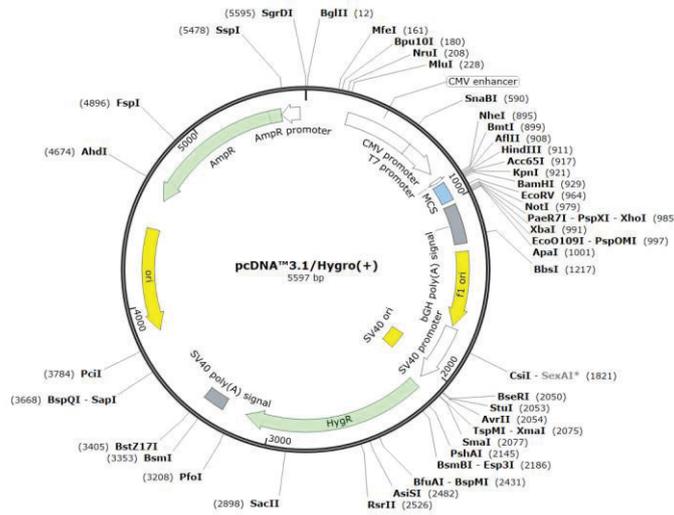


Figura 17: Mapa del plásmido pcDNA3.1. Visualización con el Software SnapGene Viewer

La secuencia codificante dentro del plásmido se muestra a continuación resaltando el péptido señal (en verde) la secuencia de h-ACE2 (1-740) (en negro), el tag de histidinas (en celeste) y el codón stop (amarillo).

>Secuencia de ACE-2 en el plásmido pcDNA 3.1

**ATGTCAAGCTCTTCCCTGGCTCCTTCTCAGCCTTGTGTGCTGTAAC**TGCTGCTCAGTCCACCATTGAGGAACAGGCCAAGACATTTTTGG  
ACAAGTTTAAACCACGAAGCCGAAGACCTGTCTATCAAAGTTCACTTGTCTCTTGAATTATAACACCAATATTACTGAAGAGAATGT  
CCAAAACATGAATAATGCTGGGGACAAATGGTCTGCCTTTTTAAAGGAACAGTCCACACTTGCCCAAATGTATCCACTACAAGAAAT  
CAGAAATCTCACAGTCAAGCTTCAGCTGCAGGCTCTTCAGCAAATGGGTCTTCAGTGCTCTCAGAAGACAAGAGCAAACGGTTGAACA  
CAATTCTAAATACAATGAGCACCATCTACAGTACTGGAAAAGTTTGTAAACCAGATAATCCACAAGAATGCTTATTACTTGAACCAGG  
TTTGAATGAATAATGGCAAACAGTTTACTACTACAATGAGAGGCTCTGGGCTTGGGAAAGCTGGAGATCTGAGGTCGGCAAGCAGCTG  
AGGCCATTATATGAAGAGTATGTGGTCTTGAAAAATGAGATGGCAAGAGCAAATCATTATGAGGACTATGGGGATTATTGGAGAGGAG  
ACTATGAAGTAAATGGGGTAGATGGCTATGACTACAGCCGCGCCAGTTGATTGAAGATGTGGAACATACCTTTGAAGAGATTAACC  
ATTATATGAACATCTTCATGCCTATGTGAGGGCAAAGTTGATGAATGCCTATCCTTCCTATATCAGTCCAATTGGATGCCTCCCTGCCT  
CATTTGCTTGGTGATATGTGGGGTAGATTTTGGACAAATCTGTACTCTTTGACAGTTCCTTTGGACAGAAACCAACATAGATGTTA

CTGATGCAATGGTGGACCAGGCCTGGGATGCACAGAGAATATTC AAGGAGCCGAGAAGTCTTTGTATCTGTTGGTCTTCTTAATAT  
GACTCAAGGATTCTGGGAAAATTCATGCTAACGGACCCAGGAAATGTT CAGAAAGCAGTCTGCCATCCCACAGCTTGGGACCTGGGG  
AAGGGCGACTTCAGGATCCTTATGTGCACAAAGGTGACAATGGACGACTTCTGACAGCTCATCATGAGATGGGCATATCCAGTATG  
ATATGGCATATGCTGCACAACCTTTTCTGCTAAGAAATGGAGCTAATGAAGGATTCCATGAAGCTGTGGGAAAATCATGCACTTTC  
TGCAGCCACACCTAAGCATTTAAAATCCATTGGTCTTCTGTACCCGATTTTCAAGAAGACAATGAAACAGAAATAAACTTCTGCTC  
AAACAAGCACTCACGATTGTTGGGACTCTGCCATTTACTTACATGTTAGAGAAGTGGAGGTGGATGGTCTTTAAAGGGGAAAATCCCA  
AAGACCAGTGGATGAAAAAGTGGTGGGAGATGAAGCGAGAGATAGTTGGGGTGGTGAACCTGTGCCCATGATGAAACATACTGTGA  
CCCCGCATCTCTGTTCCATGTTTCTAATGATTACTCATTTCATTCGATATTACACAAGGACCCCTTTACCAATTCAGTTTCAAGAAGCA  
CTTTGTCAAGCAGCTAAACATGAAGGCCCTCTGCACAAATGTGACATCTCAAACCTTACAGAAGCTGGACAGAACTGTTCAATATGC  
TGAGGCTTGGAAAATCAGAACCCCTGGACCCTAGCATTGGAAAATGTTGTAGGAGCAAAGAACATGAATGTAAGGCCACTGCTCAACTA  
CTTTGAGCCCTTATTTACCTGGCTGAAAGACCAGAAACAAGAATTCCTTTTGTGGGATGGAGTACCGACTGGAGTCCATATGCAGACCAA  
AGCATCAAAGTGAGGATAAGCCTAAAATCAGCTCTTGGAGATAAAGCATATGAATGGAACGACAATGAAATGTACCTGTTCCGATCAT  
CTGTTGCATATGCTATGAGGCGACTTTTTTAAAAGTAAAAAATCAGATGATTCTTTTTGGGGAGGAGATGTGCGAGTGGCTAATTT  
GAAACCAAGAATCTCCTTTAATTTCTTTGTCACTGCACCTAAAAATGTGTCTGATATCATTCCTAGAACTGAAGTTGAAAAGGCCATC  
AGGATGTCCCGGAGCCGATCAATGATGCTTCCGCTGTAATGACAACAGCCTAGAGTTTCTGGGGATACAGCCAACACTTGGACCTC  
CTAACCCAGCCCCCTGTTTCCATCACCATCACCATCACTAG

### *Amplificación del DNA por la metodología de Megaprep*

Para amplificar el DNA de las distintas proteínas contenidas en los vectores se realizó generalmente una *Megaprep*, utilizando una columna de purificación QIAGEN-tip 2500 y el protocolo de QIAGEN® [57]. Brevemente, luego de transformar bacterias competentes con el plásmido de interés, se estiraron placas de Petri con medio LB agar conteniendo el antibiótico de selección (Ampicilina en todos los casos). Luego de incubar alrededor de 8 horas (*over-night*) a 37°C, se picó una colonia de dicha placa y se inoculó un cultivo iniciador de entre 5-10 ml conteniendo la presión de selección. El cultivo iniciador se incubó *over-night* a 37°C con una agitación de 300 rpm. Finalizada esta incubación, se inocularon 500 ml de cultivo con 1 ml del cultivo iniciador y se incubó nuevamente a 37°C durante 12-16 horas a 300 rpm. Pasadas las 16 hs de incubación, los cultivos se centrifugaron a 6000 g durante 15 minutos a 4°C. Al pellet resultante se lo resuspendió en el buffer P1 (ver **Tabla 3** [57]), asegurándose de haber agregado RNAsa A a la preparación. Luego se añadieron 50 ml de Buffer P2 y se mezcló por inversión 4-6 veces. Posteriormente, se incubó durante 5 minutos para después agregar 50 ml de Buffer P3 frío y mezclar por inversión. Se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego se centrifugó 2 veces a 20.000 g por 30 minutos a 4°C tomando cuidadosamente el sobrenadante que contenía al plásmido de interés. En paralelo se equilibró la columna QIAGEN® usando Buffer QBT para luego aplicarle el sobrenadante de las centrifugaciones. Una vez cargada la columna (por gravedad), se realizaron lavados con Buffer QC (200 ml) para finalmente eluir el DNA con Buffer QF (35 ml). Luego se añadió isopropanol para precipitar el DNA (24.5 ml) y se mezcló y centrifugó a 15000 g durante 30 minutos a 4°C, descartando cuidadosamente el sobrenadante. Al pellet resultante se lo lavó con Etanol 70% (7 ml) y se lo centrifugó a 15000 g durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, el pellet se dejó secar a temperatura ambiente y se lo resuspendió en Buffer TE para su

almacenamiento a -20 °C. El rendimiento de la purificación fue determinado por Absorbancia a 260 nm (A260) utilizando un equipo Nanodrop (ThermoFischer®). La pureza del producto final se evaluó por medio de una corrida electroforética en geles de agarosa al 3% en buffer TBE 0.5X.

*Tabla 3: Composición de los Buffers utilizados para la purificación de los plásmidos de transfección según el protocolo de QIAGEN. Extraída de [57]*

Buffer	Composition	Storage
Buffer P1 (resuspension buffer)	50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A	2–8°C, after addition of RNase A
Buffer P2 (lysis buffer)	200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)	15–25°C
Buffer P3 (neutralization buffer)	3.0 M potassium acetate, pH 5.5	15–25°C or 2–8°C
Buffer FWB2 (QIAfilter wash buffer)	1 M potassium acetate pH 5.0	15–25°C
Buffer QBT (equilibration buffer)	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v); 0.15% Triton® X-100 (v/v)	15–25°C
Buffer QC (wash buffer)	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C
Buffer QF (elution buffer)	1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C
Buffer QN (elution buffer)	1.6 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v)	15–25°C
TE	10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA	15–25°C

### *Cultivo celular y transfección de la línea HEK293T y de la línea en suspensión Expi293™*

#### Línea HEK293T: Descongelado y expansión

Las células HEK adherentes (HEK293T), conservadas en nitrógeno líquido a -196°C, se descongelaron en un baño a 37°C durante 1 min. Posteriormente, se volcaron en un tubo con 7 ml de medio RPMI y se centrifugaron a 1000 rpm durante 4 min para separar el medio de criopreservación conteniendo DMSO de las células. Luego de la centrifugación, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 5 ml de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios), antibiótico-antimicótico, L-Glutamina y piruvato (todos Gibco) (de ahora en más, DMEM 10%). Las células se contaron en una cámara de Neubauer por medio de la técnica de exclusión de azul de Trypan y se sembraron a una densidad de  $0,3 \cdot 10^6$  cel/ml, en un frasco de cultivo T75. El cultivo se incubó en una estufa a 37°C y una presión de CO<sub>2</sub> del 5%. Las células se repicaron al alcanzar aproximadamente un 90% de confluencia (equivalente a una densidad aproximada de  $3 \cdot 10^6$  cel/ml), siguiendo un protocolo establecido

por el grupo. Brevemente, cada repique consistió en la remoción del medio de cultivo, un lavado de las células con buffer PBS (para remover restos de SFB) y la disgregación de las uniones adherentes. Este paso se realizó incubando con tripsina durante 5 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Una vez pasado este tiempo, la tripsina fue neutralizada con medio DMEM 10% y las células fueron resuspendidas y contadas en una cámara de Neubauer por medio de la técnica de exclusión de azul de Trypan para determinar su densidad. Luego, los cultivos se sembraron a una densidad aproximada de  $0,6 \cdot 10^6$  cel/ml o de  $1,2 \cdot 10^6$  cel/ml, según se deseara volver a repicar a las 24 o 48 hs, respectivamente. El volumen de cultivo necesario se colocó en un frasco nuevo y se lo llevó al volumen requerido con medio DMEM 10%, incubando luego a las células a 37°C y una presión de CO<sub>2</sub> del 5%.

#### Línea HEK293T: Transfección

En general, el protocolo de transfección consistió en expandir las células hasta llegar a la cantidad deseada, por ejemplo, 6 frascos T175 a máxima confluencia. Dichos frascos se sembraron a una densidad de  $1,2 \cdot 10^6$  cel/ml el día previo a la transfección (*Split pre-transfección*). Este *Split* se hace con el objetivo de que las células estén en un estado fisiológico óptimo. Las células se transfectaron con el plásmido que contenía al gen de interés empleando la técnica de transfección transitoria con el polímero catiónico polietilenimina de 87 kDa (PEI) (FFyB, UBA). La mezcla de transfección se preparó considerando un volumen final de 10 ml por cada frasco T175. Dicha mezcla contenía 1 µg de DNA por cada millón de células y una relación PEI:DNA de 1,5:1. La mezcla de transfección se preparó en dos tubos separados, agregando a uno el DNA y al otro PEI, empleando medio DMEM, sin aditivos. Luego de homogeneizar se traspasó el medio que contenía PEI al tubo conteniendo el ADN, agitando constantemente para favorecer la formación de los complejos PEI:DNA. Posteriormente, la mezcla PEI:DNA se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Pasado este tiempo, el medio de los frascos T175 conteniendo las células HEK fue reemplazado por los 10 ml del medio de transfección. Las células se incubaron con esta mezcla durante 3 hs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez pasado este tiempo, el medio de transfección fue descartado y los cultivos se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con medio DMEM conteniendo 2% de SFB (35 ml por frasco). Luego de 24h la temperatura de incubación se disminuyó a 33°C hasta el final del proceso con el fin de enlentecer el crecimiento celular y favorecer la producción de la proteína de interés (*Temp-Shift*).

#### Línea Expi293<sup>TM</sup>: Descongelado y expansión

La línea de células HEK293 en suspensión Expi293<sup>TM</sup> se cultivaron empleando el medio Expi293 Expression Medium (Thermo) o el medio Excell CD Viral Vector (Sigma). Los cultivos se incubaron

en Erlenmeyers (Corning) a 37°C, con una presión de CO<sub>2</sub> del 8% y con una agitación de 125 rpm acorde al manual del fabricante [58]. La viabilidad y la concentración de células viables fue determinada contando las células en cámara de Neubauer usando la técnica de exclusión de azul de Trypan. Las células se repicaron cada 3-4 días manteniéndolas en una densidad de entre 0,2 y 4·10<sup>6</sup> cel/ml acorde a lo establecido por el manual del fabricante. Para los repiques, luego de determinar la densidad celular inicial (C<sub>i</sub>) y la final deseada (C<sub>f</sub>), se utilizó la **Ecuación 9** para determinar el volumen inicial del cultivo (V<sub>i</sub>) que era necesario tomar para llegar a la densidad deseada en el volumen del Erlenmeyer (V<sub>f</sub>). La dilución se realizó empleando medio de cultivo fresco. La C<sub>i</sub> empleando cámara de Neubauer por medio de la técnica de exclusión de azul de Trypan

$$V_i \cdot C_i = V_f \cdot C_f \quad (9)$$

#### Línea Expi293<sup>TM</sup>: Adaptación al medio EXCELL CD Viral Vector (Sigma)

A fin de reducir costos, se decidió probar el comportamiento de estas células en un medio de cultivo más económico. Para ello, se empleó el medio Excell CD Viral Vector (Sigma), suplementado con 6 mM de glutamina (Gibco). Para emplear este medio de cultivo, se tuvo que realizar un proceso de adaptación de las células, que consistió en pasos o *steps*, a través de los cuales se fue cambiando gradualmente la proporción de los medios en cada repique como se indica a continuación: 100% Expi293 → 50% Expi293 : 50% Excell → 25% Expi293 : 75% Excell → 10% Expi293 : 90% Excell → 100% Excell. Una vez adaptadas las células se procedió a hacer un banco celular para futuras campañas de producción de proteínas recombinantes empleando este medio de cultivo.

#### Línea Expi293<sup>TM</sup>: Transfección

Las células fueron transfectadas con una viabilidad mayor al 95% y a densidades de entre 2 y 3·10<sup>6</sup> cel/ml acorde a lo establecido por el manual del fabricante [58]. 24 horas antes de la transfección, el cultivo en fase exponencial se centrifugó (200 g por 10 min) y resuspendió en medio fresco a una densidad de entre 1 – 1,5 ·10<sup>6</sup> cel/ml (*Split pre-transfección*). Al día siguiente, las células se centrifugaron y se resuspendieron en el medio Expression Medium a una densidad de 4·10<sup>7</sup> células por mililitro empleando 0,1% de Pluronic F-68 (Thermo). La formación de los complejos PEI-DNA se efectuó antes de la adición al cultivo celular, tal como se explicó para el caso de las células HEK293T (adherentes). Para ello, el DNA plasmídico se añadió por goteo al PEI 87 kDa (FFyB) en una relación de 1:1,5 DNA:PEI y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los complejos se formaron en la mitad del volumen final de transfección. Pasado este tiempo, la mezcla de transfección se añadió a las células de forma tal

que la densidad final fue de  $2 \cdot 10^7$  células por mililitro. Los cultivos se incubaron en Erlenmeyer a  $37^\circ\text{C}$ , con una presión de  $\text{CO}_2$  del 8% y con una agitación de 125 rpm por 3 horas. Pasadas estas horas de incubación, las células se diluyeron con medio Expression Medium o Ex-Cell hasta una densidad de  $10^6$  cel/ml y se cultivaron por cinco días a  $37^\circ\text{C}$  con una presión de  $\text{CO}_2$  del 8% y con una agitación de 125 rpm.

#### *Cosecha, purificación y almacenamiento de las proteínas recombinantes*

Las proteínas recombinantes producidas por las células de mamífero tanto HEK293T como Expi293F™ fueron cosechadas a partir del sobrenadante de cultivo por medio de una centrifugación a 200 g por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de un paso de filtración por membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  (Sartorius). Los sobrenadantes clarificados se cargaron en una columna HisTrap HP de 5 ml (GE) previamente equilibrada con buffer de unión (20 mM fosfato de sodio suplementado con 500 mM de NaCl y 20 mM de imidazol, pH 7.4). La columna se cargó con la muestra a un flujo de 1.5 ml/min usando un equipo AKTA®. Luego de lavados con el buffer de unión, las proteínas se eluyeron empleando un gradiente de 0 a 100% en buffer de elución (20 mM fosfato de sodio, 500 mM de NaCl y 500 mM de imidazol, pH 7.4). En base a los resultados obtenidos a partir del cromatograma, las distintas fracciones se juntaron y se dializaron para remover el exceso de sales e imidazol contra el buffer 25 mM Tris:HCl pH 7,6/ 0,1 M NaCl a  $4^\circ\text{C}$  en agitación durante toda la noche. Luego de la diálisis, la muestra se centrifugó a 14.000 rpm durante 8 minutos a  $4^\circ\text{C}$  para eliminar restos de posibles agregados. Posteriormente, se procedió a concentrar la proteína mediante ultrafiltración con un dispositivo Amicon de 10 o de 30 kDa de corte (Merck), para RBD o para ACE-2, respectivamente. Las muestras se llevaron a un volumen de entre 500 - 1.000  $\mu\text{l}$ . La ausencia de proteína en el filtrado se corroboró realizando el ensayo colorimétrico de Bradford en un pocillo de una placa multiwell. Posteriormente, la muestra concentrada se traspasó a un tubo tipo eppendorf para su cuantificación. La concentración de las proteínas se determinó por absorbancia a 280 nm en un equipo Nanodrop (ThermoScientific NanoDrop ONE), empleando la ley de Lambert-Beer (**Ecuación 10**)

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot C \cdot b \quad (10)$$

En donde  $\epsilon$  es el coeficiente de absortividad molar de la proteína, C su concentración y b el paso óptico. Los  $\epsilon$  se obtuvieron cargando las secuencias de las proteínas recombinantes en el programa ProtParam del servidor ExPASy [59]. Posterior a la cuantificación, la proteína se alicuotó en volúmenes de 100  $\mu\text{l}$ , se congeló con nitrógeno líquido, y finalmente se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

El nivel de purificación logrado al final del proceso se evaluó por medio de un gel SDS-PAGE y, en algunos casos, con un Western-Blot. Para el SDS-PAGE se prepararon geles de poliacrilamida 10% o 12% (en función de la proteína expresada) bajo protocolos estándar. La visualización de las proteínas se realizó por medio de la técnica de tinción por azul de Coomassie.

Para el Western Blot, también se prepararon geles de poliacrilamida 10% o 12 % y luego se realizó un Western-Blot bajo un protocolo estándar de transferencia húmeda, empleando como anticuerpo primario un mAb anti-His (Invitrogen) y un anticuerpo secundario anti-Mouse acoplado a un fluoróforo (Licor) para su detección a través del equipo Odyssey™ Imager Scanning (Licor).

### *Desarrollo y producción de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopes discontinuos de RBD*

#### *Estudios de desnaturalización de RBD por espectroscopía de fluorescencia intrínseca de triptófanos*

El efecto de distintos tratamientos térmicos y químicos sobre la conformación del dominio RBD fue evaluado por medio de espectros de fluorescencia intrínseca de triptófanos. Los distintos tratamientos aplicados a RBD fueron los siguientes:

- tratamiento térmico (95°C durante 10 minutos)
- agente reductor (DTT 10 mM)
- tratamiento térmico y agente reductor
- agente reductor y SDS 0,5%
- tratamiento térmico, agente reductor y SDS 0,5%.

Los espectros se midieron en un fluorímetro Amicon Bowman Series 2, excitando a 280 nm y midiendo la emisión en el rango de entre 285 y 440 nm. La velocidad de escaneo fue de 2 nm/seg y se tomaron 5 repeticiones para cada muestra a 25°C. En cada caso, la concentración de proteína fue de 3 µM y se utilizó una cubeta de cuarzo de 0.25 ml.

#### *Desarrollo de un método de Screening para la evaluación de la reactividad IgG dirigida contra epitopes discontinuos de RBD*

La reactividad IgG (poli- o monoclonal) contra epitopes continuos o discontinuos de RBD se evaluó por la técnica de ELISA. Para ello, la fase sólida se sensibilizó con el antígeno en estado nativo (en PBS) y, en otro pocillo, con el antígeno desnaturalizado. Para la desnaturalización del

antígeno se empleó un tratamiento consistente en añadir a la muestra DTT 10 mM, SDS 0,5% e incubar 10 minutos a 95°C. Luego de bloquear con leche descremada al 3% en PBS, se incubó con el suero de los ratones inmunizados a evaluar, o con los anticuerpos monoclonales (en forma de sobrenadante, líquido ascítico o IgG purificada). Seguidamente, se incubó con un anticuerpo secundario  $\alpha$ -mouse (Merck) acoplado a la enzima HRP para su posterior revelado empleando TMB (1 mg/ml) y agua oxigenada (1  $\mu$ l/ml). La lectura de la placa se realizó en un espectrofotómetro FilterMax a 450 nm luego de detener la reacción empleando ácido sulfúrico 2N.

### Planes de inmunización

El plan de inmunización para la obtención de los mAbs consistió en 3 inmunizaciones intraperitoneales en intervalos de 3 semanas entre sí (**Figura 18**). Cada inmunización se realizó con 20  $\mu$ g del dominio RBD purificado, diluido en buffer PBS filtrado por membrana de 0,2  $\mu$ m (100  $\mu$ l). Como adyuvante se utilizó Alum (100  $\mu$ l) y el volumen final de cada inmunización fue de 200  $\mu$ l). Luego de la 3er inmunización se realizó una sangría exploratriz.

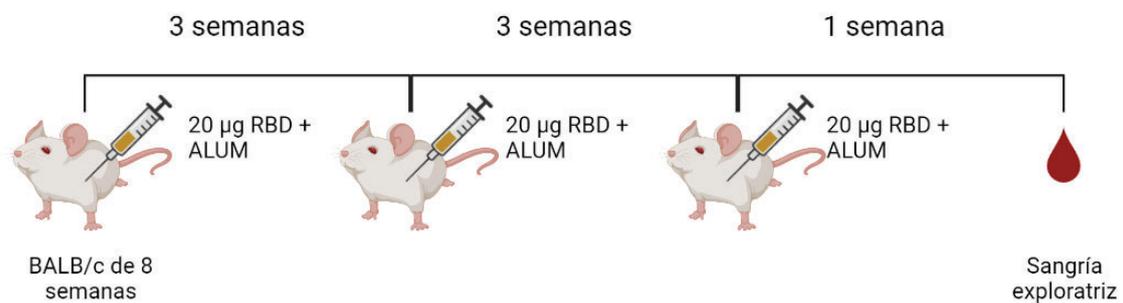


Figura 18: Esquema del plan de inmunización con RBD en Alum. Elaboración propia usando BioRender®

### Titulaciones de los sueros anti-RBD

En primer lugar, se evaluó la respuesta humoral poblacional de los ratones inmunizados empleando el *Método de Screening para la evaluación de la reactividad IgG dirigida contra epítopes discontinuos de RBD*. Para ello se juntaron los sueros de los animales inmunizados con RBD en Alum (*pool Alum*), como así también los sueros de la campaña del adyuvante de Freund realizada previamente por el laboratorio (*pool Freund*). Ambos *pools* se titularon (por duplicado) contra la proteína nativa y desnaturalizada, realizando diluciones seriadas al tercio, partiendo de una dilución 1/100. Como control negativo se utilizó suero normal de ratón (SNR). A partir de las absorbancias obtenidas se graficaron las Absorbancias a 450 nm vs la inversa de la dilución del suero mediante el programa GraphPad Prism 6. El título de cada suero se calculó como la

inversa de la dilución a la cual la curva se intersecta con la línea de corte, la cual se estableció como el valor máximo de la A450 nm del SNR + 2 veces el desvío estándar del SNR. Posteriormente, se titularon los sueros de los ratones inmunizados con RBD en Alum de forma individual para determinar qué ratones tenían mayor título anti-RBD para las fusiones celulares posteriores. En este caso, la titulación fue únicamente contra la proteína en su estado nativo.

#### *Fusión celular y evaluación de la reactividad.*

La fusión celular se realizó utilizando células de mieloma NS0 y células de bazo de los ratones con mayor título anti-RBD por medio del método de **hibridación de células somáticas** descrito por Galfré y Milstein [60]. Brevemente, las células de mieloma no secretorio de cadenas de inmunoglobulinas (NS0) se descongelaron y expandieron hasta obtener 9 frascos T75 el día de la fusión celular. El medio de expansión consistió en RPMI (Gibco) con 10% SFB (Internegocios), glutamina, piruvato y antibiótico (Gibco). Por otra parte, 3 días previos a la fusión celular se administró un *boost* pre-fusión al ratón que presentaba mayor título de suero anti-RBD. Este *boost* consistió en una inyección intraperitoneal de 20 µg de la proteína RBD en 100 µl de PBS sin adyuvante. El día de la fusión celular se sacrificó al ratón por dislocación cervical, se lo fijó a un soporte y se lo roció completamente con alcohol para evitar contaminaciones. Posteriormente, se lo abrió con pinza y tijera en un flujo laminar y se le extrajo el bazo, colocándolo rápidamente en un frasco con RPMI y antibiótico. El bazo luego se disgregó con pinza y tijera, y las células obtenidas de la disgregación se colocaron en un tubo con 50 ml de RPMI y antibiótico. Por otra parte, en el flujo laminar, las células NS0 se colectaron utilizando un *scraper*, pasando luego el total del cultivo resuspendido a tubos de 50 ml. Las células de bazo y las células NS0, ambas en sus respectivos tubos, se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min a TA. El sobrenadante de cada tubo se descartó y los pellets celulares se resuspendieron en 10 ml de medio RPMI. Ambos cultivos se contaron en cámara de Neubauer, utilizando una dilución 1/20 en solución de Turk (3% ácido acético en agua) para las células de bazo, y una dilución 1/20 en Azul de Trypan para las células NS0. En base al conteo realizado, se tomó el volumen necesario de cada tubo para obtener una relación de células bazo:NS0 1:1 y se los juntó en un mismo tubo Falcon (considerando un máximo de 100 millones de células). Una vez juntas, las células se centrifugaron durante 7 min a 1.000 rpm a TA. El sobrenadante se descartó y se agregó 1 ml de polietilenglicol 3350 (PEG 3350) al 50% en RPMI, precalentado a 37°C. Este paso se realizó en un período de 45 segundos, mezclando en forma suave y constante con la punta de la pipeta. Seguidamente, se agregaron 9 ml de medio RPMI en un período de 3 min con agitación suave, y posteriormente se agregó el volumen necesario para llegar a 50 ml de medio RPMI. La mezcla

celular se centrifugó durante 2 min a 1.000 rpm, y luego se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 115 ml de medio de selección HAT (Hipoxantina, Aminopterin, Timidina, Sigma-Aldrich) y se sembraron en 4 placas de 24 wells a razón de 1,2 ml/well. Cabe recordar que la aminopterin es un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa, involucrada en la vía de síntesis *de novo* del DNA. Los hibridomas (eventos de fusión células de bazo con células de mieloma) son capaces de sobrevivir a dicha selección únicamente si en el medio hay hipoxantina y timidina (HT), intermediarios en la vía de síntesis *de salvataje* del DNA. Los hibridomas NS0/Bazo pueden usar estos suplementos dado que tienen una copia del gen HPRT1 que codifica para la enzima hypoxanthina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT) aportada por el genoma de las células de bazo. Por otro lado, las células de bazo (o las fusiones bazo/bazo) no pueden sobrevivir porque no son capaces de multiplicarse indefinidamente en cultivo. Por lo tanto, los controles del experimento correspondieron a sembrar células de mieloma NS0 y células de bazo sin hibridar en el medio de selección HAT. A los 11 días de la fusión celular se cambió parte del medio de selección (500  $\mu$ l) de los hibridomas para disminuir los restos celulares y la presencia de anticuerpos producidos por los esplenocitos no fusionados, disminuyendo así el background del ensayo. La mezcla de la fusión se incubó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una densidad suficiente para evaluar la presencia y tipo de reactividad de los anticuerpos presentes en los sobrenadantes de cultivo mediante el ELISA descrito en la sección *Desarrollo de un método de Screening para la evaluación de la reactividad IgG dirigida contra epitopes discontinuos de RBD*. En la **Figura 19** se puede ver un esquema del protocolo de fusión realizado.

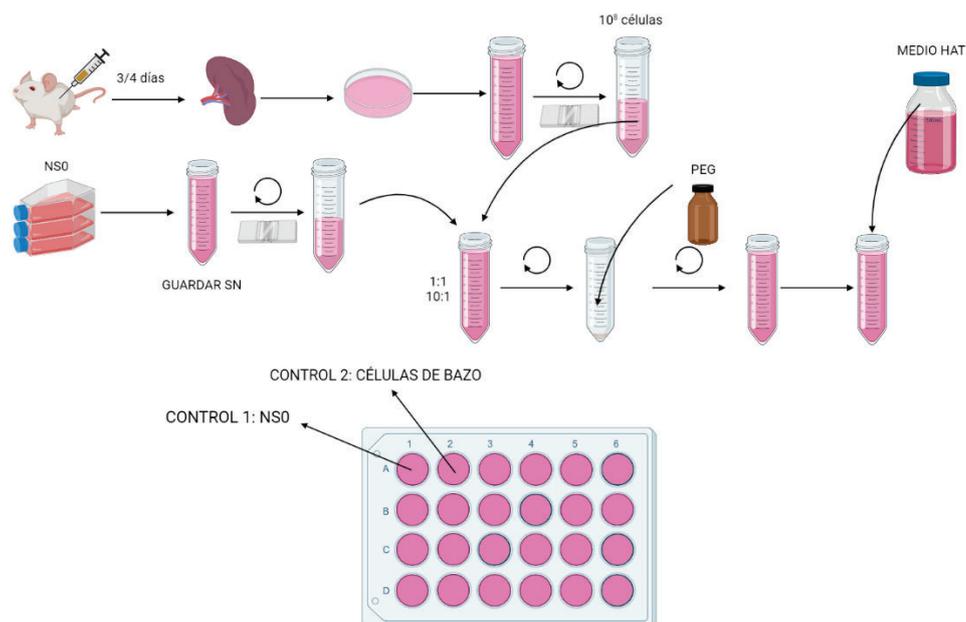


Figura 19: Protocolo gráfico de la fusión celular. Elaboración propia empleando BioRender®

Sobre los pocillos con hibridomas positivos se procedió a realizar un protocolo de clonación por dilución límite (ver más adelante). Adicionalmente, estos hibridomas se congelaron para asegurar a la línea productora de anticuerpos. Para la identificación de los hibridomas productores de anticuerpos se empleó la siguiente codificación:

### **HbXX**

En donde Hb corresponde a 'hibridoma' y 'XX' al número de pocillo del cual se extrajo dicho hibridoma.

#### *Clonación de los mAbs y criopreservación de la línea*

A fin de obtener líneas de hibridomas monoclonales efectivamente, se procedió a realizar un proceso de clonación por **dilución límite**. Para ello, los hibridomas positivos seleccionados se expandieron en un medio de cultivo conteniendo como suplemento HT (Hipoxantina, Timidina, Sigma-Aldrich). El medio de selección HAT se utiliza sólo durante las primeras 2-3 semanas luego de la fusión celular para asegurar la selección de los eventos de fusión de células de mieloma con linfocitos B (hibridomas) exclusivamente. Pasadas estas semanas iniciales ya no es necesario aplicar la presión de selección. Sin embargo, los hibridomas se expandieron en medio HT por posibles efectos de trazas de aminopterina intracelular remanente y para dar tiempo a las células de sintetizar nuevamente la enzima inhibida en presencia de la aminopterina.

Una vez expandidos, los cultivos positivos se clonaron por dilución límite para asegurar la monoclonalidad de la línea. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos. Primeramente, las células se contaron de los pocillos positivos con la técnica de exclusión de azul de Trypan para los cálculos posteriores y para chequear que la viabilidad sea superior al 90%. Luego, se hicieron diluciones seriadas del cultivo original (comúnmente 1/100) y a partir de estas diluciones se prepararon las siguientes proporciones.

- **5 células por pocillo (25 cel/ml)** en las primeras 3 filas (36 wells)
- **1 célula por pocillo (5 cel/ml)** en las siguientes 3 filas (36 wells)
- **0.5 célula por pocillo (2,5 cel/ml)** en las últimas 2 filas (24 wells).

Para las diluciones se utilizó medio de clonado, que consistió en RPMI 1640, glutamina, piruvato, antibiótico, HT, 20% de suero fetal bovino (SFB) y 20% sobrenadante de NS0 (medio condicionado). Se utiliza este medio con alta proporción de SFB y con sobrenadante de NS0 para estimular el crecimiento de los clones dentro de los pocillos, proveyendo a las células de diversos factores que promueven la división celular de los clones de hibridomas dentro del pocillo [34].

Aproximadamente 7-9 días después de la clonación se observaron las células en el microscopio y se marcaron los pocillos que presentaban un único clon bien definido. Sobre los pocillos en los que se identificaron clones únicos, se realizó un chequeo de la reactividad a partir del sobrenadante del cultivo. Así como se realizó para los hibridomas en el proceso de fusión, la selección de clones que presentaban una alta reactividad dirigida contra la proteína en su estado nativo exclusivamente fue realizada por medio del ELISA descrito en la sección *Desarrollo de un método de Screening para la evaluación de la reactividad IgG dirigida contra epitopes discontinuos de RBD*.

Los pocillos de los clones positivos se expandieron gradualmente a 2-3 wells de una placa de 96 wells y posteriormente a una placa de 24 wells. La primera expansión se realizó en medio de clonado y las siguientes en medio RPMI suplementado con 20% SFB. Una vez obtenidos 3-4 wells de placa de 24 se realizó un rechequeo de reactividad y, en caso de seguir siendo clones productores, se procedió a la expansión del cultivo para su criopreservación así como para la producción de anticuerpo a partir de sobrenadante de cultivo y/o líquido ascítico. Los clones se criopreservaron en 90% suero fetal bovino con 10% de DMSO. Para la identificación de los anticuerpos producidos por las líneas monoclonales se empleó la siguiente codificación:

#### **XXYY AL/FA**

En donde XX corresponde al número de hibridoma del cuál proviene el clon (por ejemplo, hibridoma número 23), YY corresponde al pocillo de la placa de clonado (por ejemplo, A9) y la codificación AL/FA hace referencia al plan de inmunización.

#### *Purificación de los mAbs*

En general, el proceso de purificación de los mAbs a-RBD se realizó mediante la técnica de **cromatografía de afinidad a proteína G** empleando directamente los sobrenadantes de los cultivos de los clones productores. La purificación por columna de proteína G se realizó de acuerdo al protocolo de GE [61] en el que se señalan los siguientes buffers:

- **Buffer de unión** (Buffer A): Fosfato de sodio 20 mM, pH 7. Este buffer favorece la interacción entre la proteína G y las inmunoglobulinas.
- **Buffer de elución** (Buffer B): Glicina-HCl pH 2,7. Este buffer se utiliza para eluir la muestra de forma inespecífica, bajando bruscamente el pH se manera de interferir con la interacción entre la proteína G y las inmunoglobulinas.

- **Buffer de neutralización:** Tris-HCl pH 8,8. Este buffer se utiliza para coleccionar las fracciones eluidas dado que el pH tan bajo del buffer de elución podría conducir a la desnaturalización de los anticuerpos si no se neutraliza rápidamente.

Resumidamente, el primer paso en la purificación consistió en equilibrar la columna pasando 10 volúmenes de columna (VC) (10 ml) de buffer A. Luego, se cargó la columna pasando el sobrenadante total a purificar (previamente filtrado por 0,45  $\mu\text{m}$ ). La carga se realizó aproximadamente a un flujo aproximado de 1 ml/min. Una vez pasado todo el sobrenadante, se procedió a hacer un lavado con Buffer A, de manera de remover todo lo que se haya pegado inespecíficamente a la columna. El lavado suele ser de 10 VC, aunque se hizo hasta que no se observaran proteínas saliendo de la columna (esto se chequea por la *reacción colorimétrica de Bradford*). Posteriormente, se eluyó la muestra empleando el Buffer B y se coleccionaron fracciones de 1 ml aproximadamente (normalmente se requirieron 5 fracciones para la elución total). Finalmente, se le pasó EtOH 20% a la columna y se la almacenó con esta solución para prevenir el crecimiento de microorganismos.

A las fracciones de 1 ml coleccionadas se las evaluó por el ensayo colorimétrico de Bradford para ver en cuál o cuáles se encuentra la inmunoglobulina de interés. Dichas fracciones se juntaron y se procedió a dializar el *pool* contra buffer PBS toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 14000 rpm durante 8 minutos y se cuantificó el sobrenadante por Nanodrop (empleando un  $\epsilon$  de 1,4) y se corrió un gel SDS-PAGE para evaluar la purificación.

### *Caracterización de los mAbs*

#### Western Blot

Para realizar el Western Blot, se sembraron 100 ng por calle de RBD purificada o RBD en DMEM con 5% SFB y se corrieron en un gel SDS-PAGE 12% para luego ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa (0.45  $\mu\text{m}$ , GE). La membrana se bloqueó empleando leche descremada (3% en TBS) por una hora a TA y luego fue incubada con los sobrenadantes de las distintas líneas monoclonales productoras de anticuerpos por una hora a TA. Pasados 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween 0.05%, la membrana se incubó 1 hora a TA con una dilución 1:20000 del anticuerpo  $\alpha$ -mouse IRDye800CW (Licor) diluido en leche descremada (1% en TBS). Seguidamente a realizar 5 lavados, las bandas se visualizaron en un equipo Odyssey Imager Scanning (Licor). Como control positivo, la membrana se *strippeó* y se incubó con un anticuerpo  $\alpha$ -His hecho en ratón y se reveló de la misma manera que se describió anteriormente.

### Complejo ternario mAb:RBD:ACE-2

Como parte de la caracterización epitópica de los anticuerpos monoclonales anti-RBD, se determinó la unión de los mismos contra el complejo ACE-2:RBD. Para ello se sensibilizó la placa con 0,2 µg de ACE-2 en PBS por pocillo durante toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados con PBS-Tween 0,05% se bloqueó con leche descremada (3% en PBS) 1 hora a TA. Posteriormente se lavó empleando PBS-Tween 0,05% y se realizó una curva de RBD partiendo de 4860 ng/ml y diluciones al tercio (1:3) hasta 0,247 ng/ml (curva de 11 puntos). Seguidamente, se realizaron lavados y se incubó con los sobrenadantes de los anticuerpos monoclonales. Luego, se incubó con un anticuerpo secundario  $\alpha$ -mouse (Merck) acoplado a la enzima HRP para su posterior revelado empleando TMB (1 mg/ml) y agua oxigenada (1 µl/ml). La lectura se realizó en un espectrofotómetro FilterMax a 450 nm luego de detener la reacción empleando 50 µl de ácido sulfúrico 2N. Como controles, se emplearon pocillos sin sensibilizar con ACE-2 (control background) y además controles sin mAb  $\alpha$ -RBD.

### *Marcación de los anticuerpos monoclonales con biotina*

Los mAbs 68E4AL y 86G5FA se marcaron de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante del reactivo de biotinilación [62]. Brevemente, los mAbs purificados se dializaron contra buffer carbonato 0.1 M pH 9.5 y se concentraron usando una unidad de Ultra Centrifugación Amicon® de 10 kDa de corte. Luego, la concentración resultante se determinó empleando un equipo Nanodrop (Thermo). Para biotinar a los mAbs se utilizó el reactivo (+)-Biotin N-hydroxysuccinimide ester (NHS-D-Biotin, Sigma), el cual se disolvió en DMSO a una concentración de 22 mg/ml. El reactivo de biotinilación se agregó a la solución de inmunoglobulina a una relación del 10% del volumen de la misma. La mezcla se incubó durante 4 horas a TA con inversiones. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se dializó contra buffer PBS durante toda la noche a 4°C. Las muestras de IgGs biotiniladas se cuantificaron por A280 empleando un equipo Nanodrop (Thermo) y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Para la identificación de los anticuerpos biotinilados se empleó la siguiente codificación:

#### **Bio-ZZZZ-AL/FA**

En donde Bio corresponde a 'Biotinilado', ZZZZ corresponde a la codificación descripta anteriormente y AL/FA hace referencia al plan de inmunización.

### *Elección del par de mAbs para el ensayo de captura*

Con el objetivo de obtener un par de anticuerpos de captura y detección adecuado para el ensayo de ELISA Sándwich, se probaron separadamente como anticuerpos de captura un total de 5 mAbs, los cuales fueron combinados con cada uno de los dos anticuerpos monoclonales biotinilados (Bio68E4AL y Bio86G5FA, anticuerpos de detección). Brevemente, cada uno de los mAbs se inmovilizó en una placa de 96 pocillos a razón de 0.2 µg por pocillo en PBS y se incubó durante toda la noche a 4°C. Luego, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0,05% y se bloquearon los pocillos con 200 µl de leche descremada (3% en PBS) durante 1 hora a TA. Seguidamente, se realizaron otros tres lavados y se incubó con RBD a concentración saturante (4 µg/ml en solución bloqueante). Posteriormente, los wells se incubaron con una solución 1 µg/µl del anticuerpo Bio68E4AL o del Bio86G5FA por una hora a TA. Seguimiento de 3 lavados con PBS-Tween 0,05% todos los wells se incubaron con Streptavidina acoplada a la enzima HRP (Strp-HRP, ROCHE) en una dilución 1:5000 en solución bloqueante por 30 minutos a TA. Pasados 5 lavados, se añadieron 50 µl por pocillo del sustrato TMB 1 mg/ml y agua oxigenada 1 µl/ml y se incubó durante 15 minutos a TA protegiendo la reacción de la luz. La reacción se paró con 50 µl de ácido sulfúrico 2N y se midió la absorbancia a 450 nm con un equipo FilterMax. La comparación entre los distintos anticuerpos se realizó de a pares, empleando un test t no agrupado, disponible en el software GraphPad Prism.

#### Afinidades relativas

Para determinar las afinidades relativas entre los distintos anticuerpos monoclonales dirigidos contra RBD se procedió a realizar la titulación de los mismos por medio de un ELISA indirecto. Para ello se inmovilizó RBD en PBS en una placa de 96 pocillos a razón de 0,1 µg por pocillo durante una hora a TA. Luego de realizar 3 lavados con PBS-Tween 0,05%, se bloqueó durante 1 hora empleando leche descremada (3% en PBS). Seguidamente, se lavó 3 veces con PBS-Tween 0,05% y se procedió a realizar la curva de titulación de cada anticuerpo monoclonal partiendo de una concentración de 1000 ng/ml hasta 15.6 ng/ml de IgG purificada haciendo diluciones 1:2 (curva de 8 puntos). Como control negativo se incluyó un mAb no relacionado. La incubación de la curva de titulación fue de 1 hora a TA. Posteriormente, se lavó como se describió anteriormente y se incubó durante una hora a TA con un anticuerpo α-mouse acoplado a la enzima HRP. Finalmente, se reveló y realizó la lectura de la placa como fue descrito para ELISAs anteriores.

## *Puesta a punto del ensayo de cuantificación*

### *Determinación de la dilución de la Strp-HRP (ROCHE)*

La dilución de la Strp-HRP adecuada para el ensayo se determinó por medio de un ensayo de ELISA indirecto, en el que se ensayaron concentraciones crecientes de la enzima. Para ello, se inmovilizaron 0,2 µg por pocillo del anticuerpo de detección biotinilado (Bio68E4AL) en PBS, incubando toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados con PBS-Tween se procedió al bloqueo de la placa empleando leche descremada (3% en PBS). Seguidamente, se lavó nuevamente y se incubó con distintas diluciones de la Strp-HRP (ROCHE): 1:2000, 1:5000, 1:10000 y 1:20000. Se incluyó como control de background, dos pocillos sin el anticuerpo biotinilado y con la concentración máxima (1:2000) de Strp-HRP. Posteriormente se reveló e hizo la lectura de la placa como se describió anteriormente.

### *Determinación de la concentración del anticuerpo de detección*

La concentración óptima del anticuerpo de detección se determinó por medio de una titulación del anticuerpo de detección biotinilado (Bio68E4AL) de forma directa sobre RBD en la placa en concentración conocida. Brevemente, se incubó con 0,2 µg por pocillo de RBD (Expi293) purificada en PBS, incubando toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados con PBS-Tween 0,05% se procedió al bloqueo de la placa empleando leche descremada (3% en PBS). Seguidamente, se incubó con distintas diluciones del anticuerpo de detección: 1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,125 µg/ml; 0,0625 µg/ml. Como controles se incluyeron pocillos con el anticuerpo sin biotinar, pocillos sin RBD, y pocillos sin RBD y con el anticuerpo sin biotinar (68E4AL). Posteriormente, se reveló e hizo la lectura de la placa como se describió anteriormente.

### *Ensayo de competición*

La especificidad en el reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo de detección (Bio68E4AL) se validó por medio de un ensayo de competición del anticuerpo biotinilado contra sí mismo sin biotinar. Brevemente, se incubó con 0,2 µg por pocillo de RBD (Expi293) purificada en PBS, incubando toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados con PBS-Tween se procedió al bloqueo de la placa empleando leche descremada (3% en PBS). Seguidamente, se co-incubó con 100 µg/ml del anticuerpo 68E4 sin biotinar y con distintas diluciones del anticuerpo biotinilado: 1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 0,25 µg/ml. Como control, se añadieron los mismos pocillos pero sin el anticuerpo competidor, es decir, sin el anticuerpo sin biotinar. Posteriormente, se reveló e hizo la lectura de la placa como se describió anteriormente. Las diferencias entre los distintos grupos

experimentales se evaluaron de a pares empleando un test t no agrupado, disponible en el software GraphPad Prism.

### *Ensayo de cuantificación*

#### *Protocolo del Ensayo de Cuantificación Final (Curva estándar + Spike-and-recovery)*

El ensayo de cuantificación final se realizó de la siguiente manera: Primeramente, se incubó con 0,2 µg del anticuerpo de captura (80E12AL) durante toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados con PBS-Tween 0,05% se procedió al bloqueo de la placa empleando leche descremada (3% en PBS) durante 1 hora a TA. Seguidamente, se lavó con PBS-Tween 0,05% y se incubó con la curva estándar y las muestras a determinar durante 1 hora a TA. Para la preparación de la curva estándar, se realizaron diluciones al medio (1:2) partiendo de 75 ng/ml de RBD purificada hasta llegar a 0,073 ng/ml (curva de 11 puntos más el blanco). Para la preparación de las muestras complejas con el agregado de analito (ensayo *spike-and-recovery*) se añadió 1 µl de RBD purificada (a 0,99 mg/ml en PBS) a 98 µl de distintas matrices complejas de bioprocesos de manera de emular una concentración típica de un bioproceso ( $\approx 10$  mg/L). A partir de estas preparaciones se realizaron diluciones 1/5000 en solución bloqueante ( $C_f=2$  ng/ml) y se sembraron los pocillos de la placa. Pasada la hora de incubación, se lavó nuevamente con PBS-Tween 0,05% y se incubó durante 1 hora a TA con el anticuerpo de detección (Bio68E4AL) en una concentración de 1 µg/ml (50 µl por pocillo). Pasada esta incubación, se lavó nuevamente con PBS-Tween 0,05% y se incubó con la Strp-HRP (ROCHE) por 30 minutos a TA. Luego, se lavó, reveló e hizo la lectura de la placa tal como se describió anteriormente.

#### *Determinación de atributos analíticos*

##### Método de ajuste

Los datos de la curva estándar se ajustaron empleando regresiones lineales y no lineales. Para el caso de la regresión lineal primeramente hubo que realizar una transformación de X (concentración) empleando la función logarítmica. Luego, se graficó la absorbancia (Y) en función del logaritmo en base 10 de la concentración del analito ( $\log(X)$ ). De este gráfico, cuya forma era sigmoidea, se removieron los puntos extremos que no ajustaban a una recta lineal. Seguidamente, se realizó sobre los puntos centrales una regresión lineal simple con el Método de Mínimos Cuadrados, disponible en el Software GraphPad Prism. Eso nos permitió obtener una ecuación de la recta que se empleó para el cálculo de la concentración del analito en muestras incógnitas según la **Ecuación 11**.

$$A450 = m \cdot \log(X) + b \quad (11)$$

En el caso de las regresiones no lineales, se ajustó por el Método Logístico de 4 o 5 parámetros (4PL, 5PL) disponible en la plataforma MyAssays.com. Los métodos se compararon entre sí empleando los porcentajes de recuperación y los rangos dinámicos.

#### Porcentajes de recuperación

Para evaluar la especificidad y exactitud del método analítico se determinó la concentración del analito agregado a mezclas complejas con presencia de sustancias con potencial interferente, típicas de distintos bioprocesos (Ensayo *Spike-and-recovery*). Más específicamente, se añadieron 10 mg/L del analito a soluciones de: Medio nuevo y condicionado de células Expi293; DMEM con 2% y con 10% de SFB; Medio Basal Salino de crecimiento de *P. pastoris*; LB con inductor IPTG. Una vez preparadas las distintas soluciones, se realizaron diluciones en solución bloqueante y se determinó la concentración del analito empleando el ensayo de cuantificación y se la comparó con la concentración nominal del mismo. Esta comparación se plasmó como porcentaje de recuperación del analito (**Ecuación 12**)

$$\%Recup = \frac{X}{\mu} \cdot 100 \quad (12)$$

En donde X es la concentración del analito estimada por el ensayo de cuantificación y  $\mu$  la concentración nominal del mismo en el *Spike-and-recovery*.

## Resultados

### *Producción y purificación de las proteínas recombinantes en células de mamífero*

#### *Producción de RBD*

La producción de RBD de forma recombinante fue un pilar fundamental de nuestro grupo durante el año 2020, dado que la misma ha sido utilizada para la inmunización de caballos y la posterior obtención de un suero equino neutralizante como terapia de inmunización pasiva para combatir la COVID-19 [23]. De hecho, gran parte de la motivación de este trabajo surgió de la necesidad de nuestro grupo de disponer de un ensayo que permita cuantificar en forma precisa la proteína RBD presente en el sobrenadante de cultivo celular y, en base a ello, poder optimizar su proceso productivo.

Durante aquel año, nuestro grupo produjo RBD a partir de transfecciones transitorias en células HEK293T adherentes. Esta línea celular es derivada de células embrionarias de riñón humanas y, de acuerdo a la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC), se cultiva empleando el medio completo DMEM, suplementado con glutamina 2 mM y 10% de suero fetal bovino (SFB) [63]. El agregado de SFB al cultivo es necesario porque provee al mismo de factores de crecimiento, factores de adhesión y actividad anti-tripsina, que promueven la adherencia celular [34]. Sin embargo, el empleo de SFB presenta una serie importante de desventajas, especialmente cuando se intenta producir proteínas recombinantes. Estas desventajas limitan la estandarización, la escalabilidad e incluso la aprobación regulatoria de ciertos bioinsumos [34]. Por estos motivos, una vez comenzado este proyecto, se decidió comenzar a producir RBD en un medio libre de SFB. Para ello se adquirió la línea celular Expi293F® (Gibco, Thermo Scientific), que deriva de una adaptación de la línea HEK293. Las Expi293F son células que se mantienen en suspensión y consiguen alcanzar altas densidades y muy buenos niveles de expresión transitoria de proteínas. Inicialmente, se cultivaron las células empleando el medio Expi293 Expression Medium®, comercializado por el mismo proveedor que la línea celular y diseñado especialmente para el crecimiento y expresión recombinante en esta línea. Sin embargo, dado los elevados costos de este insumo, se decidió evaluar el comportamiento de la línea en otro medio químicamente definido, pero de menor costo: el medio Excell CD Viral Vector® de Merck. Para ello fue necesario realizar una adaptación de las células a este nuevo medio (Ver más adelante)

En cualquier caso, se procedió de manera similar. Las células fueron cultivadas siguiendo el manual del fabricante [58], empleando uno u otro medio hasta alcanzar la cantidad deseada

para cada campaña. El día anterior a la transfección se realizó un *Split pre-transfección* de manera tal de asegurarse que las células estén en un estado fisiológico óptimo durante la transfección [64]. El día de la transfección, se contabilizaron las células viables y se realizaron las transfecciones únicamente si la viabilidad era superior al 95% y a densidades de entre  $2$  y  $3 \cdot 10^6$  cel/ml acorde a lo establecido por el manual del fabricante. Primeramente, las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio Expression Medium (independientemente de si habían sido cultivadas empleando el otro medio). Como la densidad de resuspensión es tan grande ( $4 \cdot 10^7$  cel/ml), se añadió Pluronic F-68, que es un surfactante no iónico empleado en los cultivos en suspensión para evitar la adherencia de las células a las paredes del Erlenmeyer y para reducir el *shear stress* producido en los cultivos con altas densidades [64].

Para la transfección transitoria se empleó el polímero catiónico PEI. El mecanismo de transfección consiste en la formación de complejos entre este reactivo y el DNA, gracias a sus altas densidades de carga positiva y negativa, respectivamente. Estos complejos formados por interacciones electrostáticas ingresarían a las células por medio de mecanismos endocíticos [64]. Este método es ampliamente utilizado por su rapidez y sencillez pero, además, por ser relativamente accesible desde el punto de vista económico [65]. La formación de los complejos entre el PEI y el DNA es un paso crítico de optimización de la transfección. En nuestro grupo, determinamos una relación de 1:1,5 DNA:PEI (en un volumen igual al presente en el cultivo a densidad  $4 \cdot 10^7$  cel/ml) y un tiempo de incubación de 15 minutos a temperatura ambiente como parámetros claves del proceso. Una vez pasado este tiempo, la mezcla de transfección se añadió al cultivo de células, reduciendo la densidad del mismo a  $2 \cdot 10^7$  cel/ml. Pasadas tres horas, el cultivo se llevó nuevamente hasta una densidad de  $10^6$  cel/ml con medio Expression Medium o Ex-Cell y se cultivaron por cinco días a  $37^\circ\text{C}$  con una presión de  $\text{CO}_2$  del 8% y con una agitación de 125 rpm. El día de la cosecha, se tomó el sobrenadante de los cultivos, se lo clarificó y se cargó la columna HisTrap tal como se describió en *Materiales y Métodos*. El cromatograma arrojado por el software del equipo AKTA® se puede ver en la **Figura 20**.

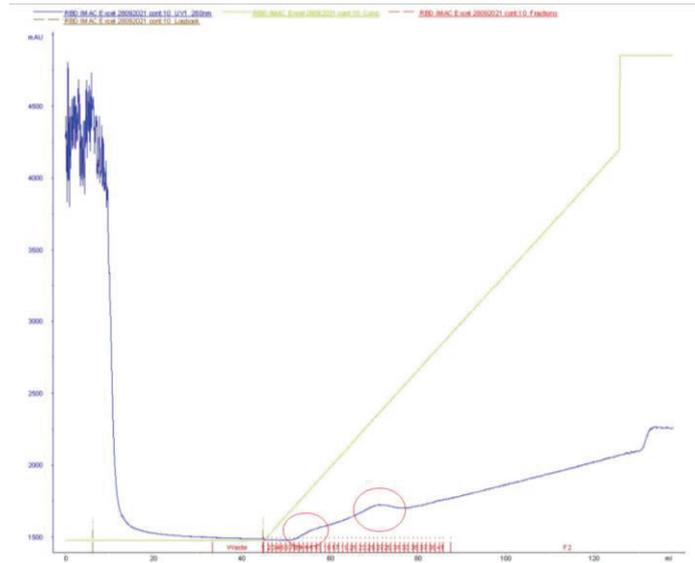


Figura 20: Cromatograma de la purificación de RBD

Como se puede observar, en el gradiente se obtuvieron dos picos iniciales (marcados en rojo) a concentraciones de Buffer B en los rangos 9-15% y 24-30%, respectivamente. Por esta razón, se juntaron las fracciones eluidas de cada pico por separado y se corrieron en un gel SDS-PAGE 12% con reductor para evaluar la presencia y grado de pureza de la proteína recombinante en cada uno de ellos. Como se puede ver en la **Figura 21**, la proteína recombinante estaba contenida en el segundo pico del cromatograma. El primer pico observado puede haber contenido una concentración pequeña de proteínas del sobrenadante del cultivo que no fueron removidas en el paso de lavado. Dado que la proteína de interés se encontraba únicamente en el segundo pico del cromatograma, se continuó trabajando con las fracciones correspondientes a éste para el cambio de buffer, concentración y cuantificación final de la proteína recombinante. El rendimiento obtenido en esta purificación fue de 3,84 mg/L de sobrenadante de cultivo original.

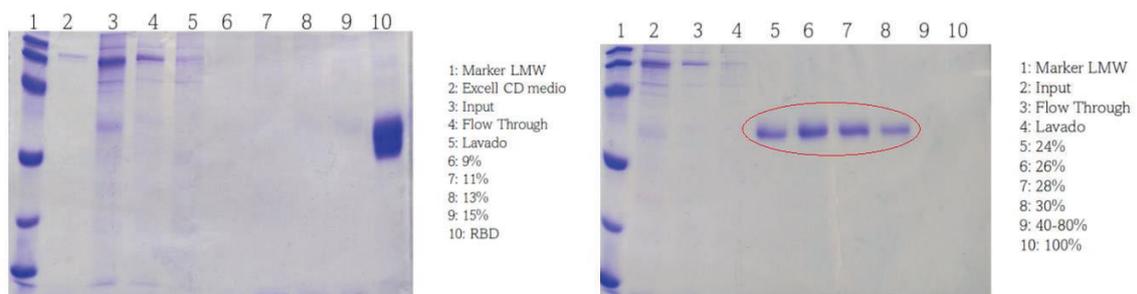
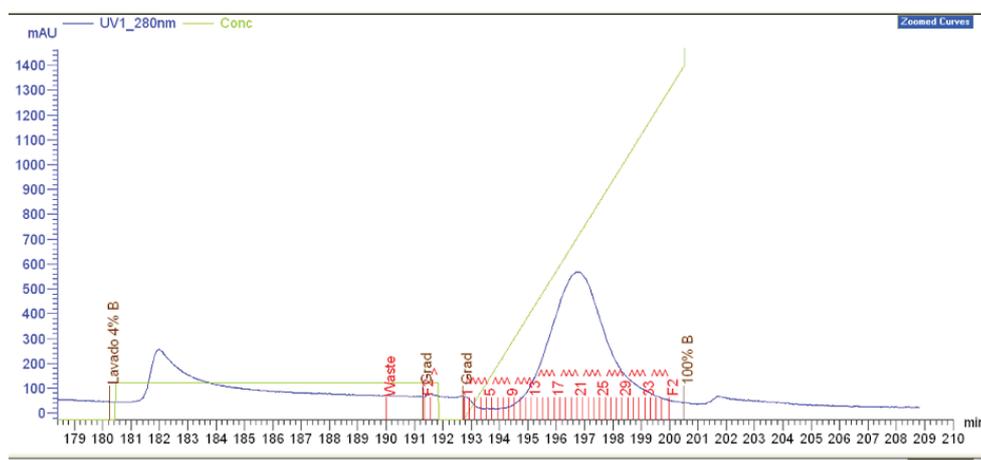


Figura 21: Geles SDS-PAGE 12% de la purificación de RBD. A la izquierda el primer pico observado en el cromatograma. A la derecha, el segundo pico.

Es interesante resaltar las calles del *Input* (siembra) y del medio de cultivo Excell CD Viral Vector de los geles SDS-PAGE. Allí se puede ver, en primer lugar, que el medio Excell CD Viral vector es un medio químicamente definido, pero no es libre de proteínas. En segundo lugar, la alta proporción de proteínas que aparecen en el *Input* en relación al medio Excell CD muestra que durante el proceso productivo ocurre una considerable liberación de proteínas al medio extracelular. Este hallazgo pone nuevamente de manifiesto las dificultades encontradas al utilizar geles de SDS-PAGE como método de cuantificación de RBD a partir de sobrenadante de cultivo, incluso en aquellos casos en los que se utilizan medios de cultivo libres de sueros, y/o con baja cantidad de proteínas.

Cabe mencionar que el crecimiento prácticamente lineal de la absorbancia a 280 nm de la curva del cromatograma de la **Figura 20** está relacionado con el aumento lineal en la concentración de imidazol en el gradiente de elución. El imidazol es una molécula orgánica aromática cuya absorbancia a 280 nm depende de la fuente de obtención del mismo y del grado de pureza. En vista de esta situación, el laboratorio adquirió un imidazol de una pureza superior al 99.5% y una A280 reportada de menos de 0,1 unidades [66], lo cual mejoró sensiblemente los cromatogramas de purificaciones de RBD y de otras proteínas con las que trabajamos en nuestro laboratorio. En la **Figura 22** se puede ver una purificación de RBD posterior, en la que se empleó este nuevo imidazol.



*Figura 22: Cromatograma de una purificación de RBD en la cual se empleó un imidazol con baja absorptividad a 280 nm. Experimento realizado por la Lic. María Eugenia Acuña Intrieri.*

### Producción de ACE-2

Con el fin de profundizar en la caracterización de los mAbs anti-RBD (ver *Caracterización de los mAbs*), se procedió a producir en forma recombinante el ectodominio de la proteína ACE-2. Además, ACE-2 también fue evaluada como proteína de captura para el ensayo de cuantificación (ver *Elección del par de mAbs*).

A fin de obtener masa de DNA suficiente para la realización de las transfecciones, se procedió a amplificar el DNA plasmídico, por la metodología de Megaprep (para el caso del DNA de RBD, el mismo había sido amplificado previamente por otros integrantes del laboratorio). Como se puede observar en la **Tabla 4**, la obtención de masa de DNA plasmídica fue efectiva. La pureza del material obtenido fue evaluada tanto por medio de la relación de absorbancias 260/230 y 260/280 como por electroforesis en gel de agarosa al 3%. Un valor de relación de A260/280 de alrededor de 1,8 y un valor de A260/A230 de alrededor de 2,2 indica que la muestra no se encuentra contaminada con fenoles, guanidinio y/u otros reactivos empleados en el protocolo de purificación [67]. En la **Figura 23** se muestra el gel de agarosa correspondiente a la corrida del plásmido de ACE-2, como así también el plásmido entero y el producto de digestión con la enzima de restricción *AseI*, que libera el inserto. Tanto la banda correspondiente al plásmido entero, como la banda correspondiente al inserto liberado tras el tratamiento enzimático, presentan el tamaño esperado.

Tabla 4: Concentración de DNA obtenido para el plásmido que contiene el gen que codifica para ACE-2. Valores obtenidos a partir del equipo Nanodrop (Thermo)

Concentración (ng/μl)	A260/280	A260/230
3,99	1,87	2,37

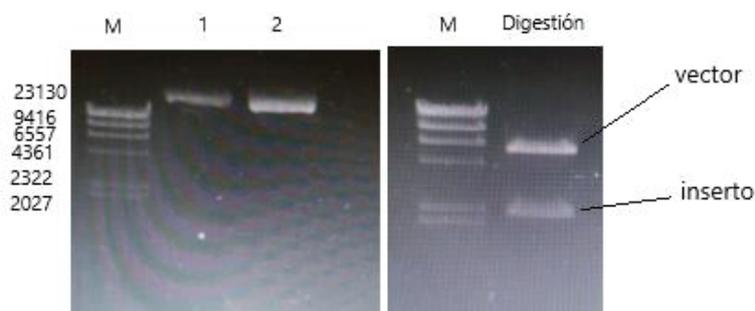
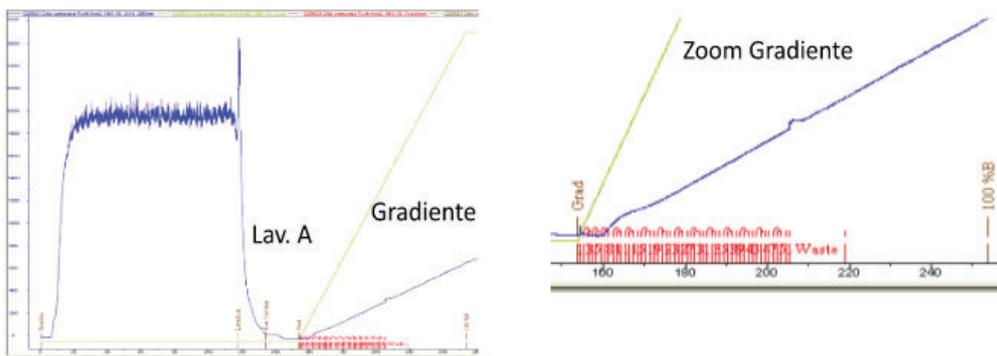


Figura 23: Imagen del gel de agarosa 3% en el que se corrió el plásmido pCDNA ACE-2 (calles 1 y 2, izquierda) y la digestión con la enzima *AseI* que libera el inserto del orden de 2220 bp. M, marcador de peso molecular  $\lambda$  HindIII.

Una vez amplificado el DNA, el mismo se empleó para la transfección transitoria de células HEK293T adherentes. En este caso se emplearon estas células porque la primera producción de ACE-2 fue realizada antes de la adquisición de la línea en suspensión Expi293F™.

Tal como para RBD, el método de transfección empleado fue el del polímero catiónico PEI y la metodología fue bastante similar (ver *Materiales y Métodos*).

El método de purificación empleado para la purificación de la proteína ACE-2 fue el de cromatografía de afinidad IMAC, haciendo uso del tag de histidinas presente en la proteína recombinante. Como se puede ver en el cromatograma de la purificación de la **Figura 24**, durante el gradiente no fue posible observar un pico bien definido, probablemente por los bajos niveles de productividad y por el hecho de haber empleado el imidazol de alta absorbancia. Sin embargo, se decidió recolectar las fracciones correspondientes al rango 5-17% de buffer B por un lado y las correspondientes al rango 23-33% B por el otro.



*Figura 24: Cromatograma obtenido durante la purificación de la proteína ACE2 mediante una columna de afinidad IMAC (izquierda). Amplificación del gradiente de elución (derecha).*

Con el fin de determinar en qué fracciones se encontraba la proteína de interés, y determinar su grado de pureza, se corrieron 2 geles SDS-PAGE, uno de ellos fue coloreado con azul de Coomassie y el otro fue utilizado para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa para hacer un Western Blot (**Figura 25**). Como se puede observar en la figura, la proteína ACE-2 estaba presente con una alta pureza entre las fracciones correspondientes al 6 a 17% de buffer B, por lo que se decidió juntar dichas fracciones para su posterior concentración y cuantificación.

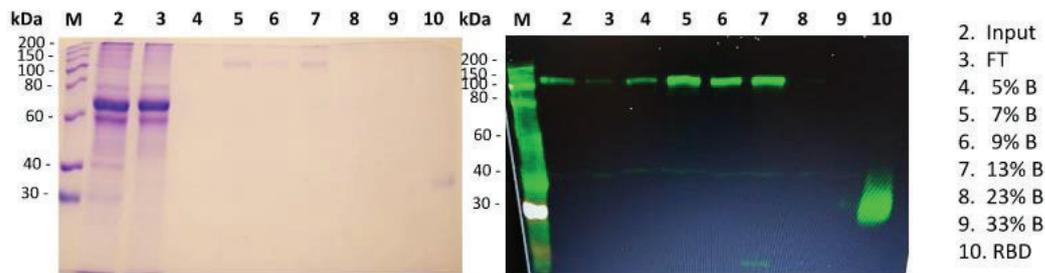


Figura 25: SDS-PAGE (izquierda) y Western Blot (derecha) de las fracciones obtenidas durante la purificación de ACE-2 por cromatografía IMAC

Luego de juntar las fracciones seleccionadas, la muestra se dializó para remover el imidazol y el exceso de sales presente en el buffer de elución. La muestra dializada se concentró por ultrafiltración en un dispositivo Amicon de 30 kDa de cut off, obteniendo un volumen final de muestra de 500  $\mu$ l. Finalmente, se realizó la cuantificación por Nanodrop, la cual se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Cuantificación de ACE-2 por la metodología de absorbancia a 280 nm empleando equipo Nanodrop (Thermo)

Dilución	A280	Concentración (mg/ml)
Tal cual	0,27	0,137
1/2	0,13	0,132

Se calculó el promedio de ambas concentraciones calculadas a partir de las diluciones, el cual resultó ser 0,135 mg/ml. Esto significa que la masa obtenida fue de 67,25  $\mu$ g (pues el volumen final de la muestra fue de 500  $\mu$ l). Teniendo en cuenta que se había partido de 120 ml de sobrenadante de cultivo, eso arroja un rendimiento final de 0,56 mg/L de sobrenadante. Este rendimiento es notablemente menor al obtenido para RBD, el cual había sido de 3,84 mg/L. Este hecho puede tener múltiples razones. En primer lugar, los sistemas de expresión fueron distintos. En el caso de RBD se emplearon las células Expi293F, que crecen en suspensión, mientras que ACE-2 se produjo empleando las células HEK293T adherentes. Por otro lado, otra de las posibles causas del bajo rendimiento en la producción de ACE-2 puede estar relacionada con el diseño de la construcción de la proteína contenida en el plásmido. El inserto codifica para los aminoácidos 1-740 de ACE-2 y dicho marco abierto de lectura (ORF) incluye un dominio *ferrodoxin-like* o *Neck-domain* (616-726), a través del cual la proteína homodimeriza [68]. Con

posterioridad, en el laboratorio se ensayó la producción de un nuevo constructo de ACE-2 que excluía estos residuos, con el cual se llegó a obtener rendimientos significativamente mayores.

#### *Adaptación de la línea celular Expi293F™ al medio Ex-Cell CD Viral Vector™*

Como se comentó anteriormente, se comenzó a emplear la línea Expi293F® para la producción de proteínas recombinantes para prescindir de la utilización de SFB en los medios de cultivo y para promover la escalabilidad de los bioprocesos. En línea con esto, se comenzó cultivando las células empleando el medio de cultivo comercializado por el fabricante, denominado Expi293 Expression Medium™. Este medio es un medio químicamente definido, libre de suero y proteínas, que se formula de manera tal que no requiere la adición de suplementos [33]. A los efectos de disminuir los costos de producción, se intentó buscar medios de cultivo alternativos que tuviesen una buena *performance* en la producción de proteínas recombinantes en este tipo celular. Así, se decidió probar el medio EX-CELL CD HEK293 Viral Vector™, comercializado por la firma Sigma-Aldrich. Este medio es un medio químicamente definido y libre de origen animal, compatible con transfecciones transitorias realizadas con el polímero PEI [69], que fue la metodología empleada en este trabajo. Este medio requiere de la suplementación con glutamina 6 mM.

Sin embargo, al emplear este medio alternativo para el crecimiento de las Expi293F™, se observó que la viabilidad celular no era la adecuada para las transfecciones. Como las células comercializadas por Gibco (Thermo Scientific) están *preadaptadas* a crecer empleando el medio de cultivo comercializado por el fabricante (Expi293 Expression Medium®), fue necesario realizar un protocolo de adaptación a este medio alternativo. Para ello se realizaron pasos o *steps* de adaptación en los que se fue disminuyendo gradualmente la concentración del medio Expi293 Expression Medium en los repiques, a expensas de un aumento en la concentración del medio EXCELL CD Viral Vector. Como se puede observar en la **Figura 26**, la adaptación de las células Expi293F al medio EXCELL CD Viral Vector fue exitosa en términos de la viabilidad celular.

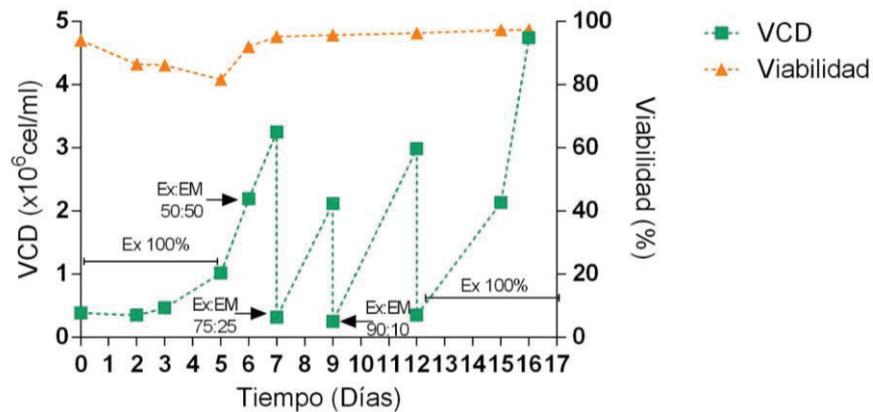


Figura 26: Adaptación de las células Expi293™ al medio Ex-Cell CD Viral Vector™

### *Desarrollo y producción de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína RBD en estado nativo*

*Desarrollo de un método de Screening para la evaluación de la reactividad IgG dirigida contra epítopos discontinuos de RBD*

Previamente, en el laboratorio se habían generado un total de tres anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio RBD. Dichos anticuerpos fueron generados en ratones BALB/c bajo un plan de inmunización en el que se empleó el adyuvante de Freund (FA) coadministrado con el antígeno RBD purificado. Esos tres anticuerpos fueron considerados candidatos potenciales para el ensayo de cuantificación, que como se ha comentado, será en formato ELISA tipo Sándwich. Sin embargo, en este tipo de ensayos es necesario que se generen un par de mAbs que reconozcan al antígeno con alta afinidad, pero, además, que lo hagan sobre epítopos distintos y no solapados, de manera que no haya impedimento estérico en el reconocimiento simultáneo del antígeno [51]. Por esta razón, se decidió desarrollar un número mayor de mAbs dado que, al aumentar el número de mAbs disponibles, también se aumenta la probabilidad de obtener un buen par de mAbs que funcionen adecuadamente en el ensayo de cuantificación. Así, para obtener más mAbs, se decidió comenzar con un nuevo plan de inmunización pero esta vez utilizando un adyuvante distinto al empleado previamente. Esta decisión fue basada en el hecho de que los adyuvantes, en su interacción fisicoquímica con el antígeno, pueden alterar su estructura tanto secundaria como terciaria y, por lo tanto, modificar el perfil de la respuesta humoral dirigida contra el antígeno en cuestión [48] [49]. Por este motivo, se decidió emplear Alum como adyuvante del segundo plan de inmunización, dada las diferencias fisicoquímicas

entre éste y el empleado previamente [48]. Idealmente, estas diferencias podrían llevar a tener más chances de obtener anticuerpos cuyos paratopes reconozcan epítopes distintos.

Sin embargo, antes de realizar el nuevo plan de inmunización, fue necesario contar con un método que permita identificar claramente las diferencias de reactividad de los anticuerpos generados con los dos adyuvantes empleados. Para ello se desarrolló un método de ELISA que permite identificar la reactividad de anticuerpos poli o monoclonales contra epítopes continuos o discontinuos de RBD. El esquema del ELISA se muestra en la **Figura 27**. Brevemente, el ensayo consistió en sensibilizar la fase sólida con el antígeno tanto en su forma nativa como en su forma desnaturalizada en pocillos distintos y luego incubar con el suero de los ratones inmunizados. Este mismo ensayo es el que se utilizó luego para evaluar la reactividad de los hibridomas y los anticuerpos monoclonales generados (en forma de sobrenadante, líquido ascítico o IgG purificada). Una respuesta positiva en la placa contra RBD en su conformación nativa pero negativa contra RBD en su estado desnaturalizado, indica el reconocimiento de un epítope *discontinuo*.

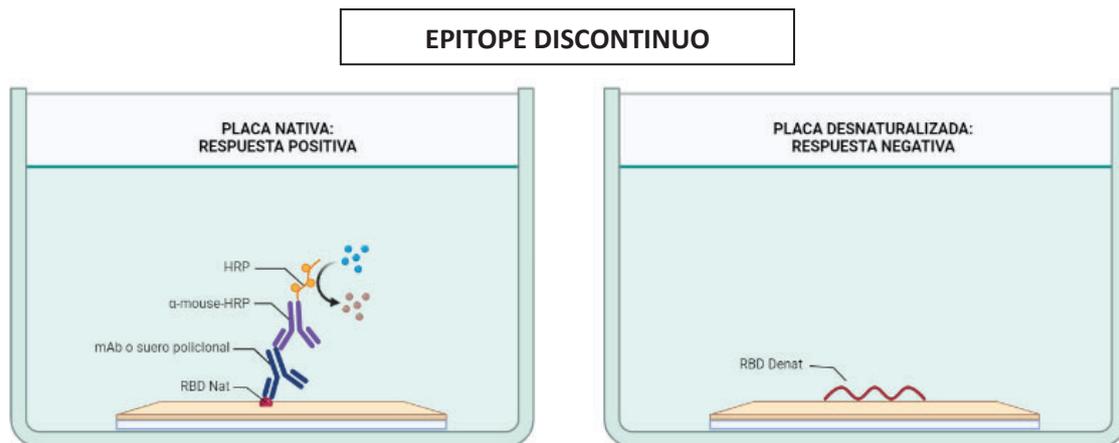
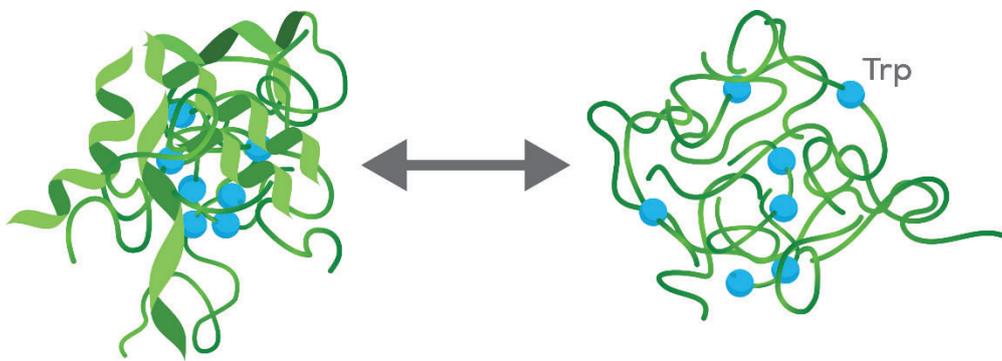


Figura 27: Esquema del Método de Screening para la caracterización de la respuesta anti-RBD nativa exclusivamente. Elaboración propia a partir de BioRender®

Por las características del ensayo, fue necesario asegurarse que la proteína estuviese completamente desnaturalizada con el tratamiento químico y térmico empleado. De otra manera, si el tratamiento hubiese sido insuficiente en desnaturalizar a la proteína por completo, se podrían haber obtenido resultados *falsos negativos* o se hubiese subestimado la respuesta dirigida contra epítopes discontinuos. Por esta razón, en el laboratorio se puso a punto un método de desnaturalización de la proteína para el cual se probaron distintos tratamientos y se midió la fluorescencia intrínseca emitida por la proteína al ser excitada con determinadas longitudes de onda. El fundamento de esta técnica radica en el hecho de que los aminoácidos aromáticos de las proteínas, principalmente el triptófano, son capaces de emitir fluorescencia

al ser excitados a una longitud de onda determinada. Este espectro de emisión de fluorescencia puede verse alterado significativamente cuando se modifica el microambiente del anillo indólico del aminoácido y, por lo tanto, este cambio en el espectro puede ser utilizado para el estudio de transiciones conformacionales, asociaciones de subunidades, unión a ligando o estudios de desnaturalización [70]. En la desnaturalización de una proteína, el microambiente del triptófano suele cambiar radicalmente dado que en el estado plegado se encuentra contenido en el centro o *core* hidrofóbico de la proteína, mientras que en el estado desnaturalizado el aminoácido queda expuesto al solvente acuoso [71] (**Figura 28** [72]).



*Figura 28: Representación esquemática de la exposición de los residuos de triptófano al solvente al desnaturalizarse la proteína. Extraída de [72].*

En el caso de la secuencia de RBD expresada en nuestro laboratorio, la misma codifica para un total de dos triptófanos que son los principales responsables de la fluorescencia intrínseca de la proteína. La **Figura 29** muestra el espectro de emisión de fluorescencia de la proteína en su estado nativo y bajo los distintos tratamientos utilizados. Como se puede ver en el gráfico, el tratamiento térmico no fue suficiente para desnaturalizar la proteína, dado que no se observa una diferencia sustancial en relación al espectro de emisión de la proteína nativa. De manera similar, el empleo único del reductor DTT no fue suficiente para promover la desnaturalización. Al combinar los tratamientos y añadir 0,5% SDS, se puede ver que sí hay una desnaturalización completa conforme se ve en el corrimiento del máximo de absorción (*shifting*) y en la disminución de la señal fluorescente (*quenching*) [70] [71].

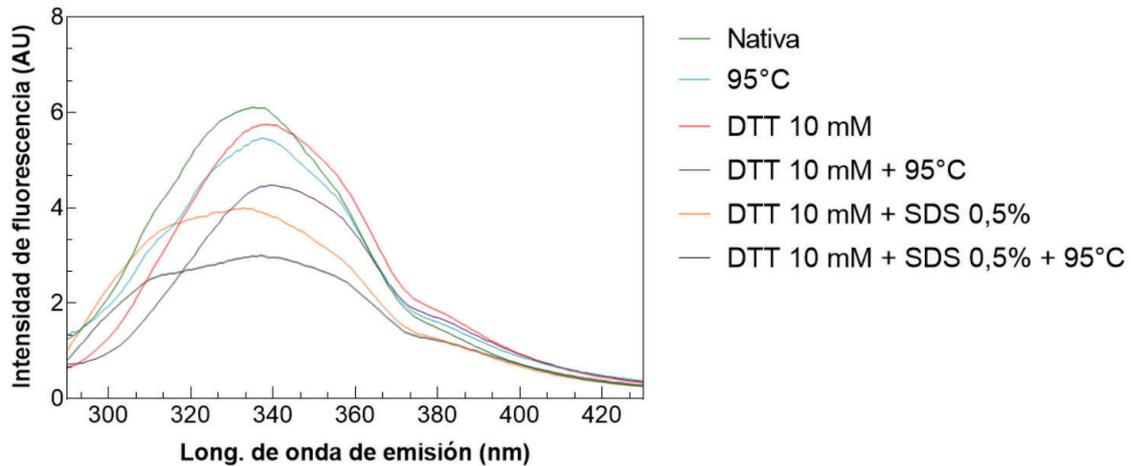


Figura 29: Espectro de fluorescencia intrínseca de la proteína RBD en su conformación nativa y bajo los distintos tratamientos. Experimento realizado por la Lic. María Eugenia Acuña Intriery.

#### Caracterización y titulación de los sueros de animales inmunizados con el dominio RBD

Una vez que el Método de screening para la evaluación de la reactividad IgG contra epítopes discontinuos de RBD estuvo validado, se empleó para la caracterización del perfil de la respuesta humoral de los ratones inmunizados con RBD y Alum en comparación con el plan de inmunización que empleó FA. Como se puede ver en la titulación de la **Figura 30**, el título de la respuesta humoral poblacional dirigida contra RBD en su estado nativo no presenta grandes diferencias entre el plan de inmunización de Alum y el de FA. Sin embargo, esta diferencia sí se hace notable cuando se observa la titulación de los sueros contra la proteína desnaturalizada. Esto indica que hay una variación en la calidad de la respuesta humoral entre los dos planes de inmunización, con una gran batería de los anticuerpos presentes en los sueros de la campaña de Freund que están dirigidos contra epítopes lineales que, por lo tanto, también están presentes cuando la proteína se encuentra desnaturalizada. En cambio, el hecho de que el título de los sueros Alum contra la proteína desnaturalizada sea más bajo, es indicativo de que hay un claro sesgo de reconocimiento hacia epítopes continuos, que desaparecen al desnaturalizarse la proteína.

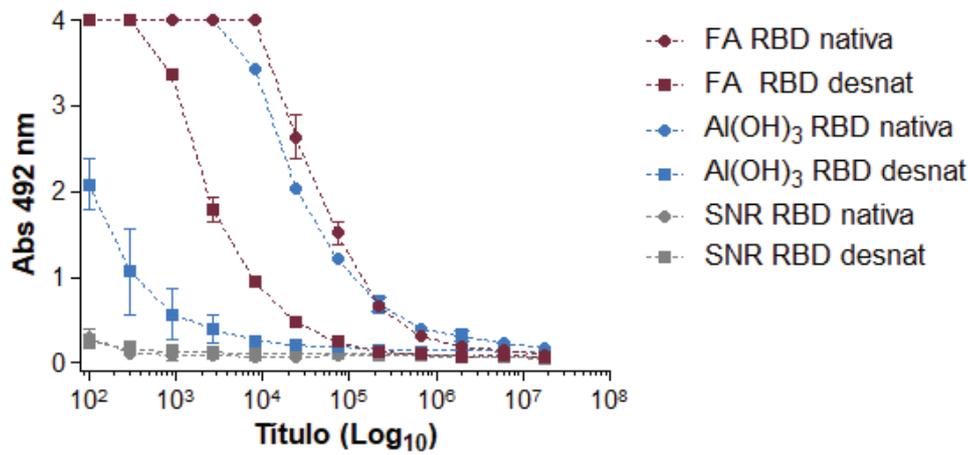


Figura 30: Título IgG anti-RBD en su forma nativa o desnaturalizada de animales inmunizados con el dominio RBD emulsionado con adyuvante de Freund o Alum.

Una vez evaluado el perfil de la respuesta poblacional, se procedió a hacer titulaciones individuales de los sueros de los ratones inmunizados bajo el plan de Alum. Esto se realizó para elegir los mejores ratones candidatos para las fusiones celulares. En este caso, las titulaciones fueron únicamente contra la proteína en su estado nativo, en un ensayo indirecto tradicional. Los resultados de las titulaciones se muestran en la gráfica de la **Figura 31**, en donde se puede ver que los ratones 2, 1 y 4 fueron los que presentaron el título de anticuerpos más elevado. Estos tres fueron los elegidos para realizar las fusiones celulares.

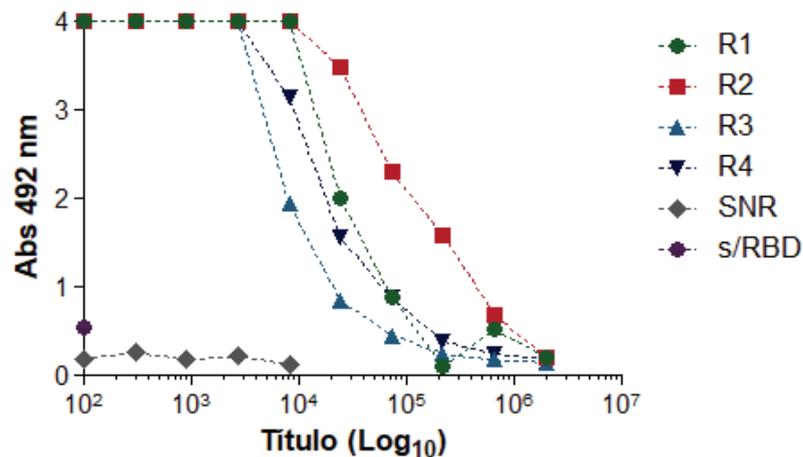
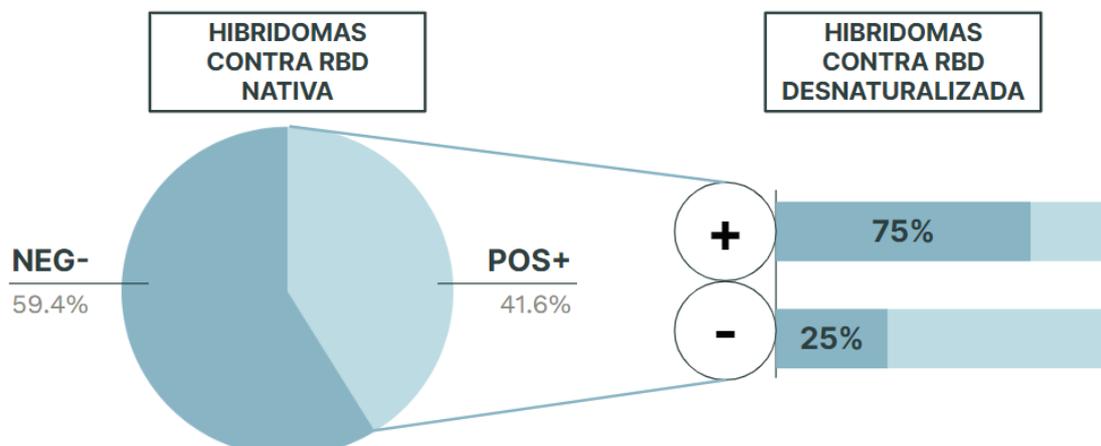


Figura 31: Gráfico de la titulación de la sangre exploratriz por la técnica de ELISA indirecto empleando la proteína RBD en su forma nativa

*Generación de hibridomas y clonación de las líneas productoras de mAbs anti-RBD nativa exclusivamente*

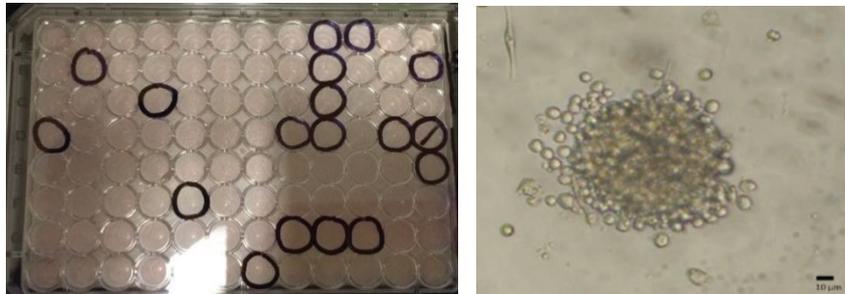
La generación de hibridomas se llevó a cabo empleando el protocolo de fusión de células somáticas descrito por Galfré y Milstein [60]. Para ello, luego de aplicar el protocolo de fusión entre las células de bazo y las células de mieloma NS0, se plaquearon las células en un total de 4 placas distintas de 24 pocillos, asegurándose de reservar pocillos para los controles de células de bazo y NS0, en donde no se observó crecimiento celular acorde a lo esperado. Al cabo de 2 semanas aproximadamente, se midió la reactividad IgG anti-RBD nativa y desnaturalizada de los sobrenadantes de cultivo. Como eran tantos pocillos, se evaluó primero la reactividad contra la proteína nativa y de los pocillos con *alta reactividad* (correspondientes a un 41,6% del total) se realizó, al día siguiente, un nuevo ensayo empleando la proteína desnaturalizada. De esta última placa, se seleccionaron los pocillos con *baja reactividad* (correspondientes a un 25% de los hibridomas ensayados). Las proporciones obtenidas se pueden observar gráficamente en la **Figura 32**.



*Figura 32: Proporciones de pocillos con alta y baja reactividad en los chequeos realizados sobre los hibridomas obtenidos a partir de las fusiones celulares. Un pocillo fue considerado de alta reactividad si la densidad óptica (OD) era mayor a 2,0, mientras que fue considerado de baja reactividad si la OD era menor a 0,3. Resultados correspondientes a una de las fusiones celulares realizadas.*

Con el fin de asegurar la monoclonalidad de las líneas, los cultivos candidatos se clonaron luego por dilución límite, uno de los métodos más ampliamente utilizados para la clonación celular [34]. En la **Figura 33** se puede ver una de las placas de clonado. El panel izquierdo muestra la forma en la que se identificaron los pocillos en los que había *clones únicos* y en el panel de la derecha se muestra la imagen de uno de dichos clones. Esto se realizó manualmente empleando

el microscopio óptico invertido. Cabe aclarar que el medio de clonado que se empleó para hacer las diluciones fue un medio rico en suero fetal bovino y en *medio condicionado* de las células NS0, para promover el crecimiento de las células centro del pocillo [34].



*Figura 33: Imagen de una placa de clonado con los pocillos marcados en donde se encuentran clones únicos (izquierda) e imagen de campo claro en microscopio óptico invertido de un clon único en uno de dichos pocillos (derecha).*

Finalmente, pudieron obtenerse tres clones con alta reactividad dirigida contra la proteína RBD en su estado nativo exclusivamente: los clones 23A9AL, el 80E12AL y el 68E4AL. El resto de los hibridomas candidatos no lograron pasar el procedimiento de clonación con éxito debido a cuestiones tales como pérdida de reactividad, multiplicidad de clones por pocillo o ausencia de crecimiento, contaminación, etc. En la **Figura 34** se pueden ver un ELISAs de control de la reactividad IgG anti-RBD nativa y desnaturalizada de todos los mAbs generados en el laboratorio. Como se puede ver, los mAbs generados con el plan de Freund presentan una alta reactividad dirigida tanto contra la forma nativa como desnaturalizada de la proteína, indicando que están reconociendo epítopes continuos en RBD. Por el contrario, los mAbs obtenidos durante el plan de Alum presentaron alta reactividad contra RBD en el estado nativo únicamente, indicando una reconocimiento de epítopes discontinuos de la proteína.

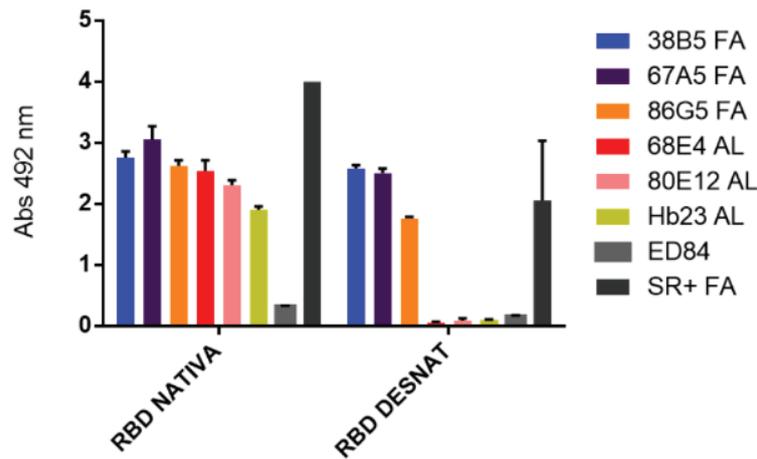


Figura 34: Resultados del ELISA de chequeo de reactividad de los clones de la campaña de ALUM y de la campaña de Freund (realizada previamente por el grupo). ED84: mAb no relacionado. SR + FA: Suero de ratón positivo, obtenido bajo la campaña de Freund

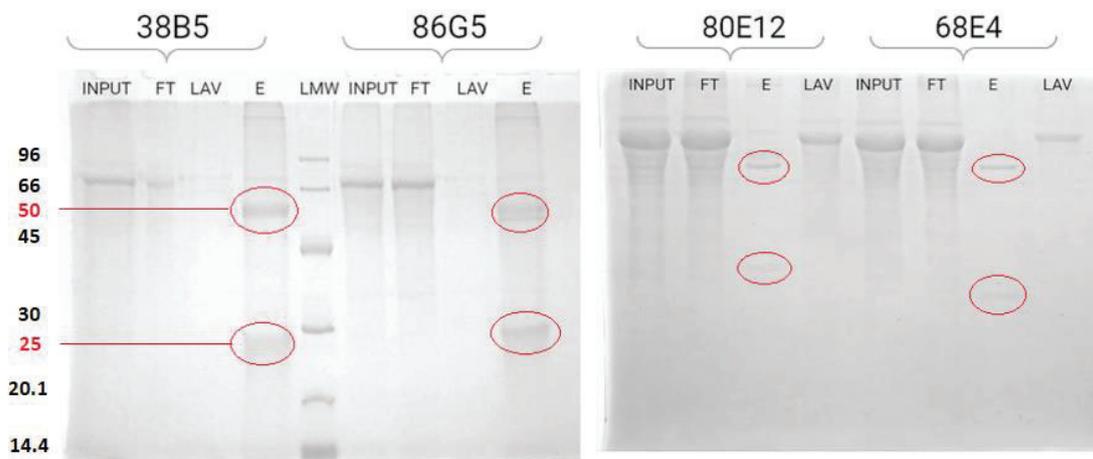
Lamentablemente, luego de una serie de pasajes, la línea 23A9AL mostró una pérdida de la reactividad, razón por la cual el ELISA de cuantificación se continuó desarrollando con los 5 mAbs disponibles: 38B5FA, 67A5FA, 86G5FA, 80E12AL y 68E4AL.

#### Purificación de los mAbs

Los distintos anticuerpos monoclonales a-RBD obtenidos por nuestro grupo se purificaron por medio de una cromatografía de afinidad a proteína G. La proteína G es una proteína de superficie que expresan bacterias del género *Streptococcus* de los grupos C y G [73]. Básicamente es un receptor que se une a la región constante (Fc) de las inmunoglobulinas mediante un mecanismo no-inmune, similar a lo que ocurre con la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, las proteínas A y G poseen distintas especificidades en función del origen, el tipo y el subtipo de la inmunoglobulina [61]. Dadas las características de los anticuerpos obtenidos (IgG de ratón) se decidió emplear una columna de proteína G, empleando una bomba peristáltica en la mesada. Brevemente, la purificación consta de un primer paso de unión en el cual la inmunoglobulina interacciona con la fase estacionaria. Luego, sigue un paso de lavado en el que se remueven las interacciones inespecíficas de otras proteínas que se hayan unido durante el paso de unión. Finalmente, la elución se realiza por una bajada abrupta del pH que disrumpe la interacción de la fase móvil con la fase estacionaria. Inmediatamente, las fracciones eluidas son colectadas en tubos con un buffer de neutralización.

En la **Figura 35** se pueden observar los geles SDS-PAGE correspondientes a las purificaciones de los anticuerpos 80E12AL y 68E4AL y de los anticuerpos 38B5FA y 86G5FA. Si bien estas últimas

dos líneas habían sido obtenidas previamente por otros integrantes de nuestro grupo de trabajo, en esta oportunidad los 4 mAbs fueron purificados en simultáneo a fin de contar con todo el material necesario para los siguientes experimentos. En el eluato (E), se pueden observar las bandas correspondientes a las cadenas livianas y pesadas de los anticuerpos (círculos rojos), identificadas por su peso molecular de 25 y 50 kDa, respectivamente. En la conformación nativa de una inmunoglobulina, estas cadenas permanecen unidas mediante puentes disulfuro (**Figura 9**), razón por la cual las cadenas pesadas y livianas se ven como bandas separadas en presencia de un agente reductor. En la **Tabla 6** se detallan los valores de rendimiento y de masa obtenida.



*Figura 35: Geles SDS-PAGE 12% de la purificación de los anticuerpos monoclonales producidos por los clones de la campaña de Freund (panel izquierdo) y de la campaña de ALUM (panel derecho). FT: Percolado, LAV: Lavados, E: muestra final de fracciones eluidas seleccionadas, LMW: marcador de bajo peso molecular*

*Tabla 6: Valores asociados a la purificación de los mAbs anti-RBD de los planes de inmunización con FA y ALUM*

	<b>Clones FA</b>	<b>Clones ALUM</b>
<b>Volumen de partida</b> (de sobrenadante)	<b>38B5:</b> 40 ml <b>86G5:</b> 71 ml	<b>68E4:</b> 28 ml <b>80E12:</b> 17 ml
<b>Masa obtenida<sup>4</sup></b>	<b>38B5:</b> 0,57 mg <b>86G5:</b> 0,81 mg	<b>68E4:</b> 1,08 mg <b>80E12:</b> 0,46 mg
<b>Rendimiento<sup>5</sup></b>	<b>38B5:</b> 14,25 mg/l <b>86G5:</b> 11,00 mg/l	<b>68E4:</b> 38,6 mg/l <b>80E12:</b> 27,0 mg/l

<sup>4</sup> La masa obtenida se calculó a partir del volumen final y la concentración de proteína obtenida, la cual se midió por absorbancia a 280 nm en un equipo Nanodrop considerando un  $\epsilon$  de 1,4 ml/mg.

<sup>5</sup> Masa de proteína pura respecto del volumen de sobrenadante de cultivo.

## Caracterización de los mAbs

### Western Blot

La técnica de Western Blot es muy útil para caracterizar la especificidad del reconocimiento de los mAbs contra la proteína de interés. Además, en este caso, también es útil para caracterizar la forma en la que se reconoce a RBD: en su estado nativo y desnaturalizado, o en su estado nativo exclusivamente. En la **Figura 36** se puede ver el Western Blot realizado para los tres mAbs del plan FA más el mAb 23A9AL, del plan Alum. Como se puede notar, el reconocimiento de los mAbs 38B5FA, 67A5FA y 86G5FA es específico dado que no hay reactividad dirigida contra ninguno de los componentes del suero fetal bovino ni del medio DMEM (calle 2). Por otro lado, el ensayo muestra que el mAb 23A9AL no reconoce a la proteína RBD presente en la membrana que, por las características del ensayo, está en su estado desnaturalizado. Por lo tanto, estos resultados constituyen una validación metodológica de los datos obtenidos previamente en los ensayos de ELISA. El panel de la derecha (a-His) es un control positivo del ensayo que muestra que efectivamente la proteína está presente en la membrana y que, por lo tanto, la ausencia de señal en el caso del mAb 23A9AL corresponde a una falta de reconocimiento de la proteína en ese estado de plegamiento y no a la ausencia de la misma. Los Western Blot de los otros 2 mAbs generados con el adyuvante de alum (80E12AL y 68E4AL) arrojaron un *background* muy alto como para ser analizados, posiblemente debido a un error en el bloqueo de la membrana.

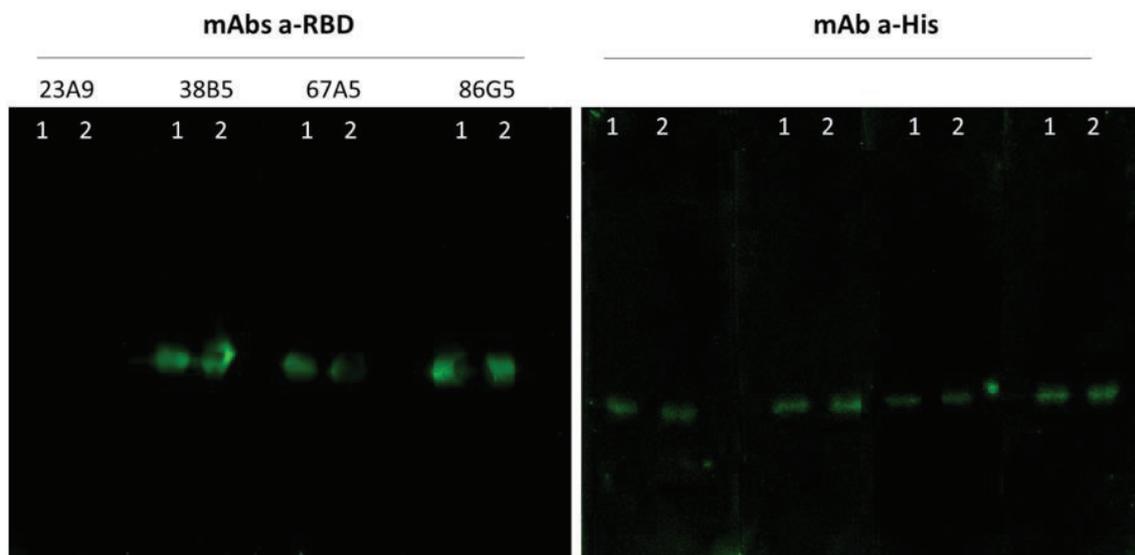


Figura 36: Western Blot realizado para los mAbs anti-RBD 23A9AL, 38B5FA, 67A5FA y 86G5FA. Las calles numeradas con 1 corresponden a la proteína RBD pura, mientras que las calles numeradas con 2 corresponden a la proteína RBD pura diluída en medio de cultivo DMEM con 2% de SFB. El panel de la derecha muestra un control de reactividad con un anticuerpo anti-His.

### Complejo ternario

El mapeo epitópico hace referencia al proceso experimental que identifica el sitio de unión o *epitope* de un anticuerpo sobre su molécula target o antígeno [74]. Esta información es de suma importancia dado que puede proveer información mecánica clave de la interacción y dar cuenta de las aplicaciones que el anticuerpo podría tener. A los efectos de los mAbs obtenidos en este trabajo, resultaba de particular interés saber si el sitio de reconocimiento de los mismos interfería con la unión de RBD con ACE-2 dado que, de ser así, los mAbs podrían además tener una aplicación interesante como potencial agente terapéutico [5] o como reactivos de diagnóstico en ensayos de detección de anticuerpos neutralizantes [75]. Por esa razón, se realizó un ensayo en el que se inmovilizó ACE-2 en la placa, luego se incubó con distintas diluciones de RBD, y finalmente con los distintos mAbs para evaluar si existía o no unión sobre ese complejo (Figura 37). De existir, eso significaría que el sitio de unión del mAb con RBD no interfiere con el sitio de unión de RBD con ACE-2. Caso contrario, existiría una competencia o impedimento estérico en el reconocimiento de RBD entre ACE-2 y el mAb. Como se puede ver en la Figura 37 el mAb 67A5 es capaz de formar un complejo ternario con RBD y ACE-2, sugiriendo que su sitio de reconocimiento no coincide con la superficie de interacción entre el dominio RBD y su receptor celular.

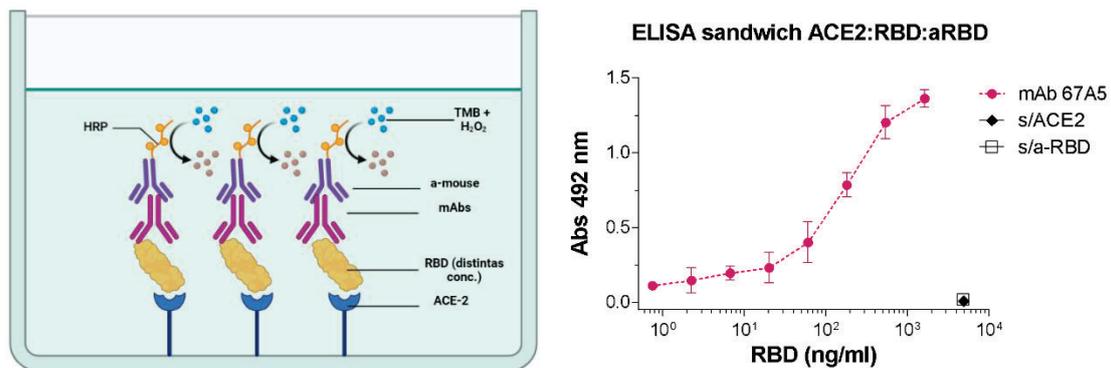


Figura 37: Curva dosis-respuesta para el caso del mAb 67A5FA en interacción con el complejo ACE-2:RBD

En este momento se están llevando a cabo ensayos similares con el resto de los mAbs generados. Cabe remarcar que las absorbancias registradas en el ensayo son sustancialmente menores al valor máximo que podría obtenerse con el reactivo OPD. Este hecho podría deberse a una disminución de la cantidad efectiva de ACE-2 inmovilizada en la placa, lo cual dejaría una menor cantidad de sitios disponibles para interaccionar con RBD. Es conocido el hecho de que la

inmovilización a la fase sólida puede alterar la estructura de las proteínas lo que, en última instancia, puede afectar los sitios de interacción con las biomoléculas subsiguientes en el inmunoensayo [51, 53]. Por este motivo, en estos momentos, en el laboratorio se está trabajando en la optimización del protocolo de sensibilización de la placa con ACE-2.

### *Marcación de los anticuerpos monoclonales con biotina*

Una vez purificados los mAbs, se decidió comenzar con la marcación con biotina de un mAb de cada plan de inmunización de manera de tener más chances de obtener un par que funcionen bien en conjunto. Dados los rendimientos obtenidos en la purificación (**Tabla 6**) se decidió comenzar marcando a los anticuerpos 68E4AL y al 86G5FA.

La marcación con biotina consiste en la adición covalente de biotina a un residuo aminoacídico o a un azúcar de una proteína. En la naturaleza, la biotililación ocurre en un grupo de enzimas conocidas como carboxilasas, pero sólo en un único residuo de lisina [76]. La marcación de biomoléculas (como anticuerpos) con biotina presenta importantes ventajas en relación a otras marcaciones empleadas en los inmunoensayos, tales como la marcación enzimática. En primer lugar, como la amplia mayoría de las proteínas no están biotiniladas (y las que lo están, lo hacen en un único residuo [76]), el *background* o ruido es bajo. Por otro lado, la interacción biotina-estreptavidina es una de las más fuertes de la naturaleza ( $K_D = 10^{-14}$  M), por lo que se puede emplear esta interacción para efectuar detecciones realmente sensibles si se usan moléculas de estreptavidina conjugadas a enzimas (como HRP) u otros sistemas de detección. Además, la biotina es una molécula pequeña de tan sólo 244 Da y, por lo tanto, es muy poco probable que interfiera con la actividad biológica de las moléculas marcadas [77]. En este caso, se empleó el reactivo NHS-Biotina el cual reacciona eficientemente con los grupos aminos primarios para formar enlaces amidas estables (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). Los anticuerpos poseen varias aminas primarias plausibles de ser marcadas, tales como los grupos amino-terminales y los presentes en las cadenas laterales de las lisinas.

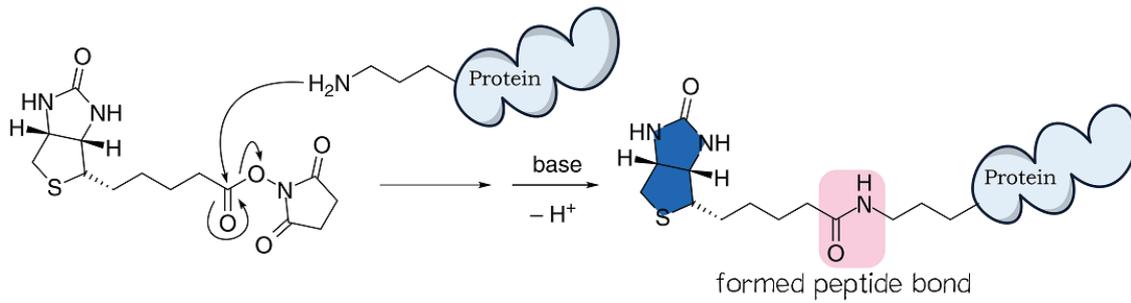


Figura 38: Mecanismo de reacción simplificado de la biotinylation de proteínas empleando el reactivo NHS-Biotina. Imagen adaptada de [78]

La biotinylation se realizó acorde al protocolo del fabricante [62]. El grado de biotinylation de los mAbs se evaluó por medio de un ELISA cuyo diagrama se muestra en la **Figura 39-izquierda**. Brevemente, se realizó una inmovilización de los mAbs a la fase sólida, seguida de una incubación con estreptavidina acoplada a la enzima HRP para el revelado posterior empleando el sustrato TMB y agua oxigenada. Como se puede observar en la **Figura 39-derecha**, la biotinylation de los anticuerpos 68E4AL y 86G5FA fue exitosa, alcanzándose una altísima relación señal ruido con cada uno de ellos. A partir de este momento, los anticuerpos biotinylados fueron identificados como Bio68E4AL y Bio86G5FA.

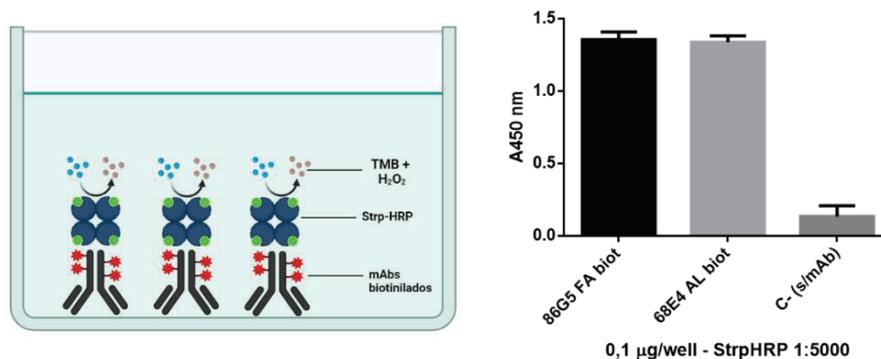


Figura 39: Esquema del ELISA empleado para el chequeo de la biotinylation de las inmunoglobulinas (IgG (izquierda). Reacción colorimétrica obtenida con los mAbs 86G5FA y 68E4AL biotinylados (derecha).

### Elección del par de mAbs óptimo para el ensayo de captura

Con el objetivo de obtener un par de anticuerpos de captura y detección adecuado para el ensayo de ELISA Sándwich, se probaron separadamente como anticuerpos de captura el total de los 5 mAbs, los cuales fueron combinados con cada uno de los dos anticuerpos monoclonales biotinylados (Bio68E4AL y Bio86G5FA, anticuerpos de detección). Dada la alta afinidad de dominio RBD por ACE-2 [11] [14], además de los mAbs, se evaluó el comportamiento de la proteína ACE-2 como reactivo de captura. Como se puede ver en el gráfico de la **Figura 40-izquierda** el anticuerpo Bio68E4AL mostró una buena *performance* como anticuerpo de

detección cuando fue combinado con los anticuerpos 80E12AL y 38B5FA como anticuerpos de captura. Entre estos dos últimos, no se observaron diferencias significativas en estas condiciones. Por otro lado, los resultados de A450 obtenidos con el anticuerpo Bio86G5FA como mAb de detección fueron notablemente bajos para todas las combinaciones ensayadas (**Figura 40-derecha**), lo cual despertó la hipótesis de que el paratope del anticuerpo Bio86G5FA estuviese modificado o parcialmente desnaturalizado, no pudiendo reconocer a RBD adecuadamente.

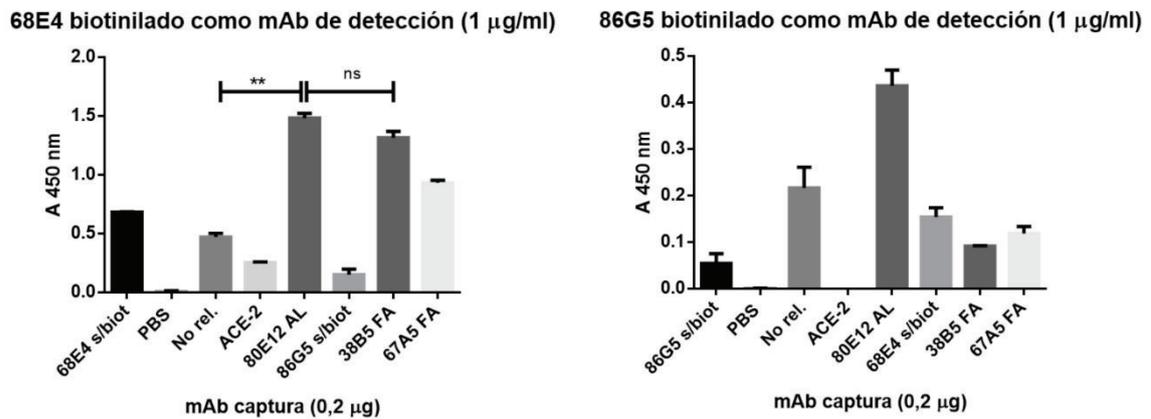


Figura 40: Resultados del ELISA de captura realizado para la elección del mejor anticuerpo de captura combinado con cada uno de los mAbs biotinilados

#### Titulación de los mAbs anti-RBD

Para comprobar la hipótesis de si el paratope del anticuerpo Bio86G5FA se había perdido durante el protocolo de purificación, se realizó una titulación de los mAbs anti-RBD sin biotinilar, que se puede ver en la **Figura 41**.

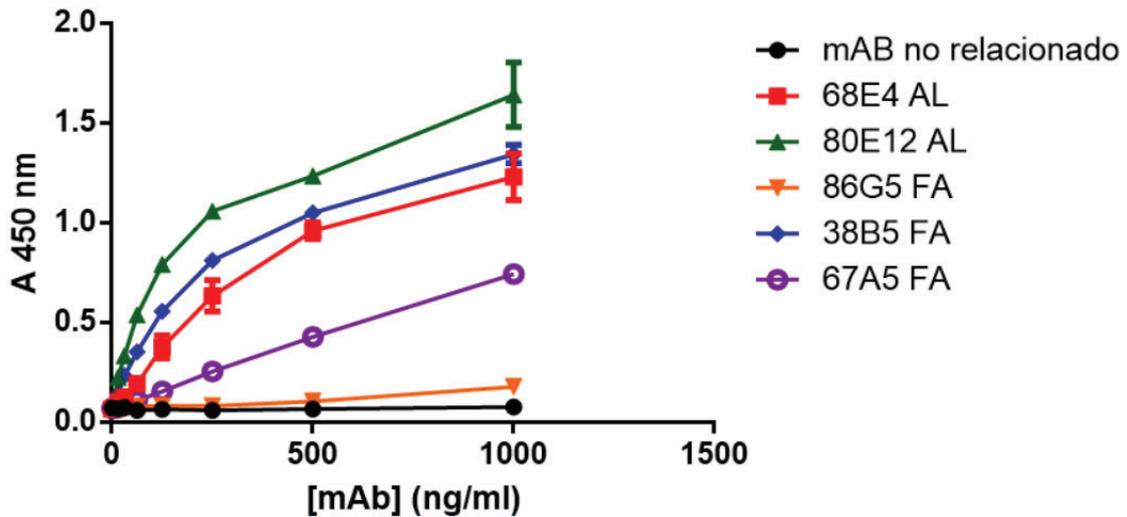
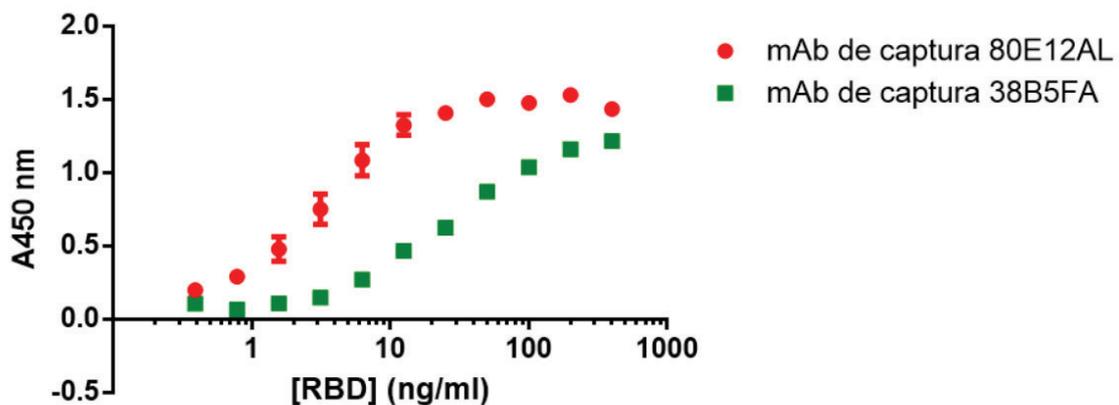


Figura 41: Titulación de los distintos mAbs contra RBD nativa

La titulación del mAb 86G5FA corrobora lo observado en el ensayo del mAb biotinilado. Una posible explicación para este comportamiento podría ser la pérdida de actividad debido al protocolo de purificación empleado. Tal como se explicó en *Materiales y Métodos*, el método empleado para la purificación de los anticuerpos monoclonales fue el de cromatografía de afinidad de proteína G. La elución en este tipo de cromatografía es por pH ácido y, por lo tanto, es propicia a la desnaturalización de las moléculas capturadas por la fase sólida. Si bien el protocolo contempla un paso rápido de neutralización de las fracciones eluidas, es posible que este paso se haya demorado unos minutos de más o bien, no haya alcanzado el pH deseado, conduciendo así a la desnaturalización (al menos parcial) de la inmunoglobulina provocando que ésta pierda su paratope. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que el patrón de corrida de las cadenas livianas y pesadas de la inmunoglobulina purificada coincidía con el esperado (**Figura 35**), descartando así una eventual degradación o ausencia de la molécula. Posteriormente, la Lic. María Eugenia Acuña Intrieri realizó una nueva purificación a partir de líquido ascítico de ese mAb empleando la misma metodología, y pudo obtener el anticuerpo con una alta reactividad indicando nuevamente que evidentemente se trató de un error metodológico.

Estos resultados indican que hubiese sido conveniente realizar una titulación de los mAbs purificados antes de continuar con la biotinilación y la posterior realización del ensayo de la **Figura 40**, a fin de ahorrar tiempos, reactivos y obtener un parámetro más de caracterización de los mAbs.

Con el objetivo de avanzar con el ensayo de cuantificación se decidió elegir al anticuerpo Bio68E4AL como anticuerpo de detección. Como en el resultado del ensayo de la **Figura 40** no se obtuvieron diferencias significativas entre los anticuerpos de captura 80E12AL y el 38B5FA, se decidió hacer una curva de concentración de RBD (empleando concentración fija del anticuerpo de captura y del anticuerpo de detección), para evaluar con más detalle la sensibilidad de cada uno de los dos esquemas. Como se puede ver en la **Figura 42**, el esquema que incluía al anticuerpo 80E12AL como anticuerpo de captura fue más eficiente en la detección de RBD. Por este motivo, se decidió continuar con el par 80E12AL como mAb de detección y con Bio68E4AL como mAb de detección.



*Figura 42: Ensayo tipo Sandwich realizado para la elección del mejor mAb de captura empleando al mAb Bio68E4AL como mAb de detección.*

### *Puesta a punto del ensayo*

Una vez elegido el esquema final del ensayo de cuantificación, se procedió a poner a punto el ensayo en sí. Esta puesta a punto incluyó la determinación de la concentración óptima de la estreptavidina acoplada a la enzima HRP (Strp-HRP, sistema de revelado) y la del anticuerpo de detección Bio68E4AL. En la **Figura 43** se puede ver el ensayo en donde se determinó la concentración óptima del reactivo Strp-HRP. Para ello, se inmovilizaron 0,2 µg por pocillo del anticuerpo de detección biotinilado (Bio68E4AL) y se ensayaron concentraciones crecientes de la Strp-HRP. Como se puede ver en la Figura, a partir de la dilución 1:10.000, se observa una abrupta caída en la A492. Por esta razón, se escogió la dilución 1:5.000, de manera de trabajar en una concentración de saturación, pero que esté cerca de la caída de la señal, para poder detectar diferencias en la concentración del analito. Como control de background se añadieron pocillos con la IgG sin biotinilar y la máxima concentración de Strp-HRP (1:2.000).

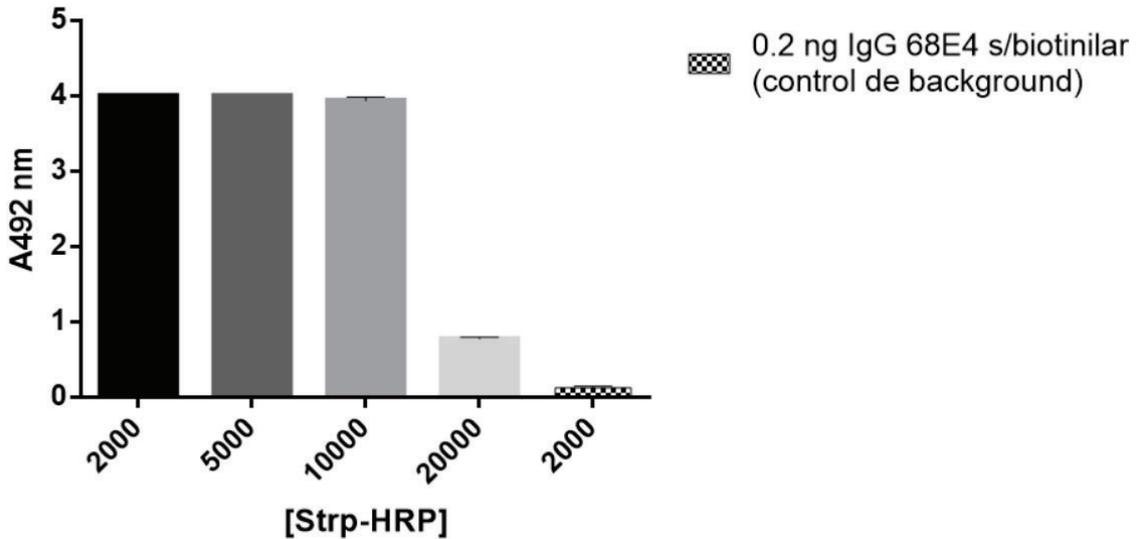


Figura 43: Determinación de la concentración óptima de Strp-HRP

Luego, se pasó a la determinación de la concentración óptima del anticuerpo de detección Bio68E4AL. Esta concentración se determinó por medio de una titulación del anticuerpo biotinilado de forma directa sobre RBD en la placa. Brevemente, se incubó con 0,2  $\mu\text{g}$  por pocillo de RBD y luego con distintas diluciones del anticuerpo de detección. Como se puede observar en la **Figura 44**, la señal mostró un comportamiento directamente proporcional a la concentración del Bio68E4AL con un muy bajo nivel de *background* que se hace evidente por la extremadamente baja señal observada a la concentración máxima de Bio68E4AL sin RBD inmovilizada en la placa. Por este motivo se determinó a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  como la concentración adecuada del mAb de detección a utilizar en el ensayo final.

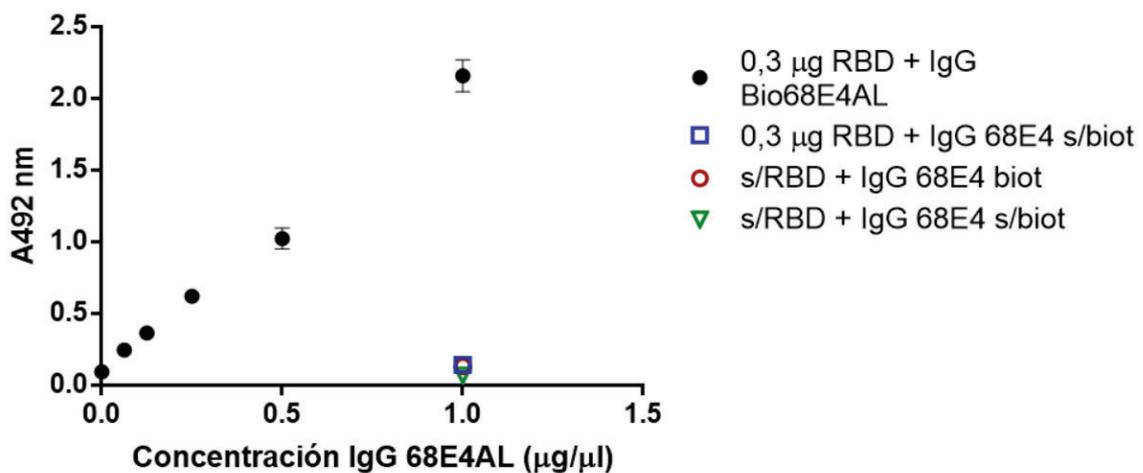


Figura 44: Determinación de la concentración óptima del anticuerpo de detección Bio68E4AL

Para evaluar la especificidad en el reconocimiento de RBD a esta concentración por parte del mAb de detección, se hizo un ensayo competitivo del anticuerpo biotinilado Bio68E4AL contra el mismo anticuerpo pero sin biotinar (68E4AL). El esquema del ensayo se representa en la **Figura 45-izquierda**. Como se puede observar en el gráfico de barras de la **Figura 45-derecha**, el reconocimiento de los epitopes del mAb 68E4AL es específico, lo que se pone de manifiesto en la competencia observada entre ambos anticuerpos. Además, se vuelve a evidenciar una reactividad dosis-respuesta tanto en ausencia como en presencia del competidor.

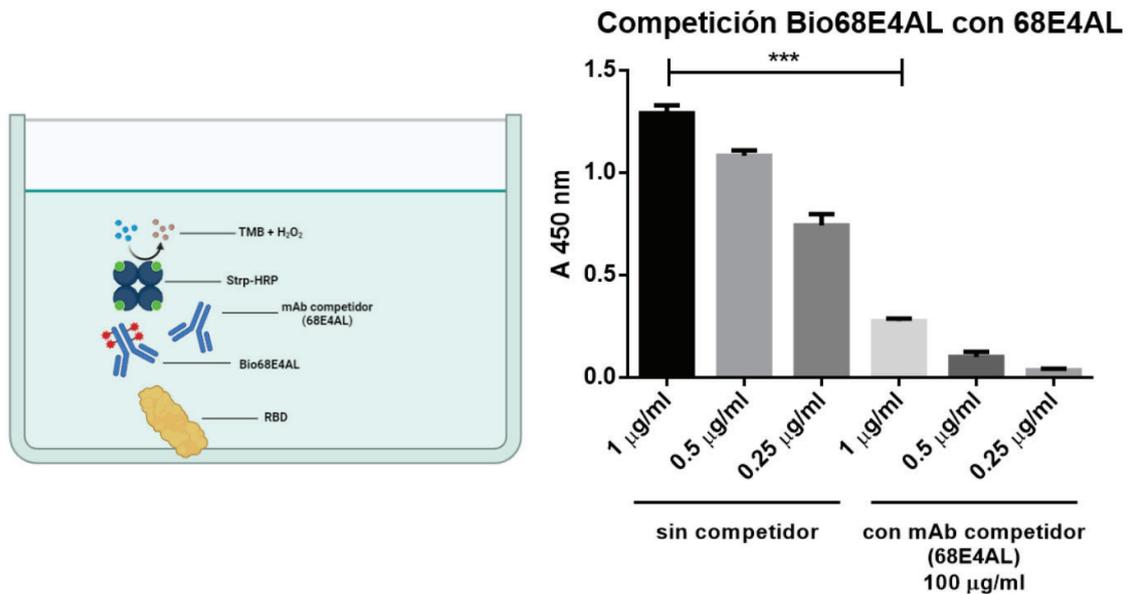


Figura 45: Esquema del ELISA competitivo empleado para la evaluación de la especificidad del mAb 68E4AL (izquierda). Reacción colorimétrica obtenida con y sin el agregado del mAb competidor (derecha).

### Ensayo de cuantificación final

Una vez que se pusieron a punto las concentraciones de todos los reactivos del ensayo de cuantificación, se procedió a ejecutarlo en su formato final para evaluar el funcionamiento del mismo y calcular ciertos atributos analíticos. El esquema del ensayo final puede verse en la **Figura 46**.

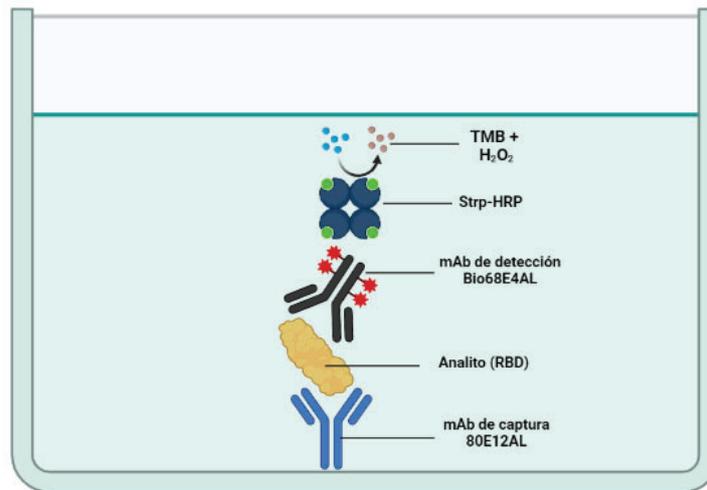


Figura 46: Esquema del ELISA de cuantificación del dominio RBD de la proteína Spike. Realizado en BioRender®.

Como todo ELISA Sándwich de cuantificación, el mismo exige que se realice una curva de calibración empleando un **estándar de referencia** [51]. En el caso de este trabajo se trabajó con un *estándar in-house*, correspondiente a la proteína RBD purificada de la misma manera que se la purificó y empleó como inmunógeno para la generación de los mAbs y todos los ensayos descritos anteriormente. En desarrollo analítico, este tipo de estándares son los empleados durante la etapa de desarrollo del producto, dado que no se compara con un estándar de referencia oficial [79]. Las diluciones realizadas del estándar de referencia fueron elegidas considerando los límites de detección y cuantificación observados en ensayos comerciales similares [80].

Como se ha enfatizado, una de las grandes potencialidades de un ensayo tipo ELISA Sándwich para la cuantificación de una biomolécula tan importante como RBD, es que la cuantificación puede ser realizada directamente sobre muestras de bioprocesos. Esa capacidad se puso a prueba durante este ensayo, realizando una prueba de **spike-and-recovery**. La idea del *spike-and-recovery* es añadir (*spike*) una cantidad conocida del estándar de referencia en distintas muestras complejas y calcular la concentración del analito presente en dicha muestra empleando el ensayo de cuantificación [55]. A partir de los valores conocidos y los estimados, es posible calcular un **porcentaje de recuperación** según la ecuación:

$$\%Recup = \frac{X}{\mu} \cdot 100 \quad (13)$$

En donde X es la concentración del analito estimada por el ensayo de cuantificación y  $\mu$  la concentración nominal del mismo en el *Spike-and-recovery*.

El *spike-and-recovery* de RBD se realizó sobre matrices generalmente empleadas en bioprocesos de la industria biotecnológica, tales como el medio químicamente definido Expression Medium de las células Expi293F (fresco y gastado), el medio DMEM con 2% y 10% de suero fetal bovino, el medio basal salino (MBS) empleado para crecimiento de *P. pastoris* y el medio LB con el inductor IPTG, empleado en el crecimiento de ciertas bacterias. Para ello se agregó RBD purificada en dichas matrices a una concentración típica de un bioproceso ( $\approx 10$  mg/L). A partir de esas soluciones, se realizó una dilución 1/5000 en solución bloqueante para que los valores de A450 caigan dentro de la curva de calibración. En el gráfico de la **Figura 47** se puede ver el resultado del ensayo de cuantificación final con todos los *spike-and-recovery* representados.

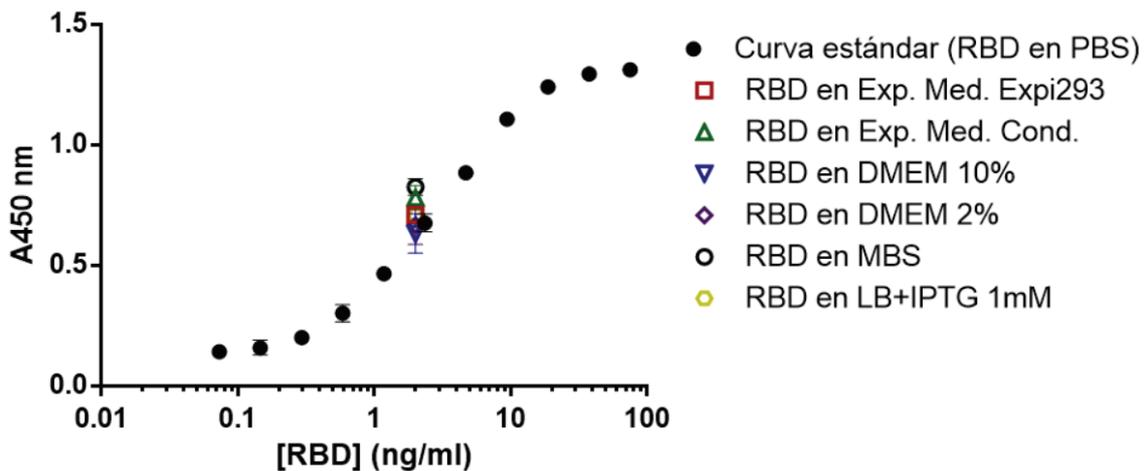


Figura 47: Resultados del ensayo de cuantificación del dominio RBD. Se puede ver la curva estándar realizada con RBD purificada (en PBS) en los círculos rellenos (•) y los distintos Spike-in realizados sobre las distintas matrices empleadas en bioproceso.

Como se puede ver, la curva estándar tiene la forma sigmoidea característica de este tipo de inmunoensayos, reflejando que los valores de concentración de RBD elegidos para la construcción de la misma fueron adecuados.

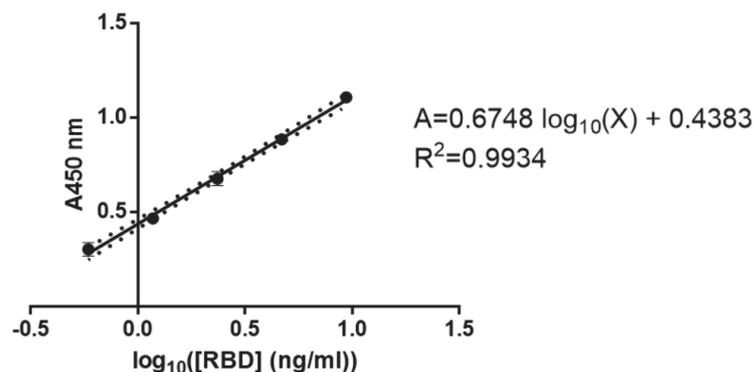
Para calcular los valores de las distintas muestras de bioprocesos es necesario hacer uso de una ecuación que se deriva de la curva de calibración. Una de las formas más tradicionales y simples de hacerlo es encontrar una región de la curva que muestre un comportamiento de la señal directamente proporcional a la concentración del analito [81]. A partir de esa región, se hace una **regresión lineal** por el método de mínimos cuadrados para construir el modelo

$$y = \beta_0 + \beta x + \varepsilon \quad (14)$$

En donde  $y$  es la variable dependiente,  $x$  la variable independiente y  $\varepsilon$  corresponde a la desviación aleatoria del modelo. Cabe aclarar que, en caso de ser necesario, tanto  $y$  como  $x$  pueden sufrir transformaciones matemáticas para mostrar una relación lineal [81]. En nuestro trabajo, la **Ecuación 14** toma la forma de:

$$A_{450} = \beta_0 + \log_{10}[RBD] + \varepsilon \quad (15)$$

Tomando los valores centrales de la curva estándar se pudo realizar una regresión lineal, originando el gráfico y la ecuación de la **Figura 48**. La *bondad de ajuste* es medida por el coeficiente de determinación  $R^2$ , que refleja la proporción de la variación en la variable  $y$  que sería atribuible a una relación lineal entre  $x$  e  $y$  [81]. Cuanto más cercano a 1 es el valor de  $R^2$ , más exitoso es el modelo de regresión lineal simple. Como se puede ver en la figura, el valor de  $R^2$  resultante es 0,9934, lo cual refleja un muy buen ajuste de los datos al modelo lineal.



*Figura 48: Regresión lineal por el método de mínimos cuadrados realizada sobre los puntos centrales de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.***

A partir del análisis de regresión lineal se puede ver que se obtuvo un **rango dinámico lineal** que va entre los 0,586 ng/ml y 9,375 ng/ml. El rango o intervalo lineal de un método analítico es el intervalo de concentraciones de analito en que su respuesta es proporcional a la concentración y puede ser calculada empleando la curva de calibración [82]. Esto no significa que la cuantificación tenga el mismo grado de confianza a lo largo de toda la curva. De hecho, cuanto más lejos se está del centro de masa (o centroide) de la curva, mayor es la incertidumbre asociada a la determinación del valor de  $x$  empleando la curva de calibración (**Figura 49**). Esto se representa con las *bandas de confianza*, que se pueden ver como líneas punteadas en la **Figura 48**.

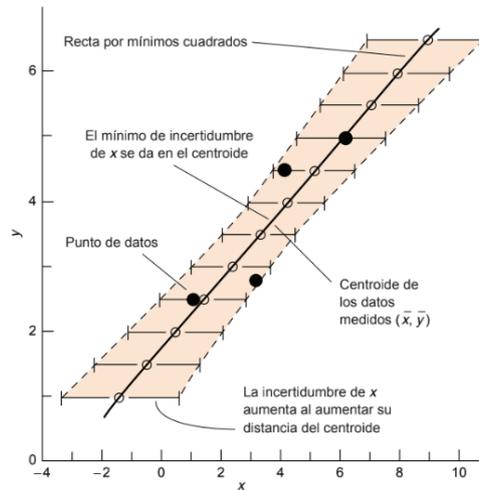


Figura 49: Intervalos de confianza en la determinación de  $x$  empleando la curva de calibración. Cuanto más cerca se está del centro de masa de la curva, mayor es la certidumbre en relación a la determinación. Extraída de [82].

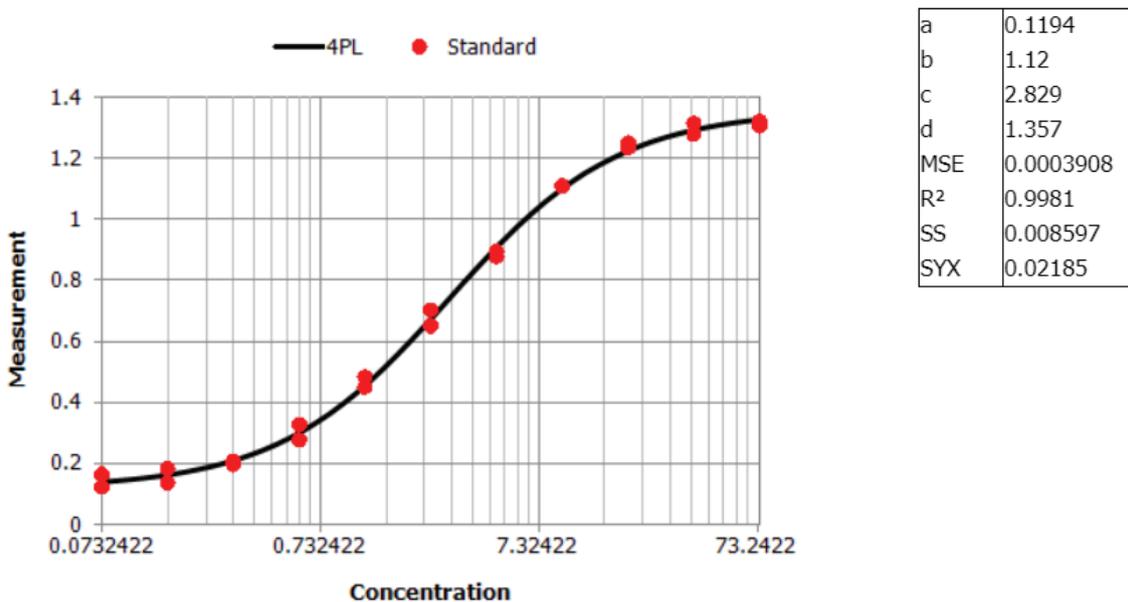
Sin embargo, para este tipo de ensayos, existen otras formas de ajustar los datos observados a modelos estadísticos más complejos. Estos modelos corresponden a las regresiones *logísticas de 4 y de 5 parámetros*. La **regresión logística de 4 parámetros (4PL)** es adecuada cuando la curva sigmoidea típica de estos inmunoensayos es simétrica con respecto al punto de inflexión. En cambio, si ese no es el caso, es conveniente emplear la **regresión logística de 5 parámetros (5PL)**, la cual, añadiendo un parámetro más a la ecuación, es capaz de ajustar datos que no sean simétricos con respecto al punto de inflexión [83]. A continuación, se muestran las ecuaciones que describen ambos modelos [84]:

<p><b>4PL</b></p> $y = d + \frac{a - d}{\left[1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right]}$	<p><b>5PL</b></p> $y = d + \frac{a - d}{\left[1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right]^g}$
---	---

en donde:

- $d$  es la asíntota horizontal cuando la concentración del analito tiende a infinito
- $a$  es la asíntota horizontal cuando la concentración del analito tiende a cero
- $b$  es la *pendiente de Hill*. Hace referencia a cuán empinada es la curva
- $c$  es el punto de inflexión
- $g$  es el factor de asimetría

Dado que nuestro conjunto de datos de la curva estándar mostró una forma sigmoidea simétrica con respecto al punto de inflexión, se decidió emplear el modelo 4PL para el ajuste de los datos haciendo uso del software MyAssays, disponible gratuitamente a través de myassays.com [85]. Como se puede ver en la **Figura 50** los datos se ajustaron muy bien al modelo estadístico arrojado por el software, lo que también se ve reflejado en los parámetros de ajuste reportados por el programa. Por un lado, el  $R^2$  es cercano a 1 y por el otro, los bajos valores del error cuadrático medio (MSE), de la suma de cuadrados (SS) y del error estándar de la estimación (SYX) reflejan una baja discrepancia entre los valores predichos por el modelo y los valores reales [81].



*Figura 50: Ajuste de los datos de la curva estándar del ensayo de cuantificación empleando el modelo estadístico logístico de 4 parámetros (4PL).*

En este caso, el **rango dinámico logístico** va desde 0,073 ng/ml hasta 75 ng/ml porque los puntos de los extremos no fueron removidos, sino que fueron empleados para la construcción del modelo estadístico. De hecho, esto constituye una de las ventajas principales del ajuste logístico en relación al ajuste lineal, dado que extiende el rango de muestras que es posible determinar empleando el modelo, como se muestra esquemáticamente en la **Figura 51** [83].

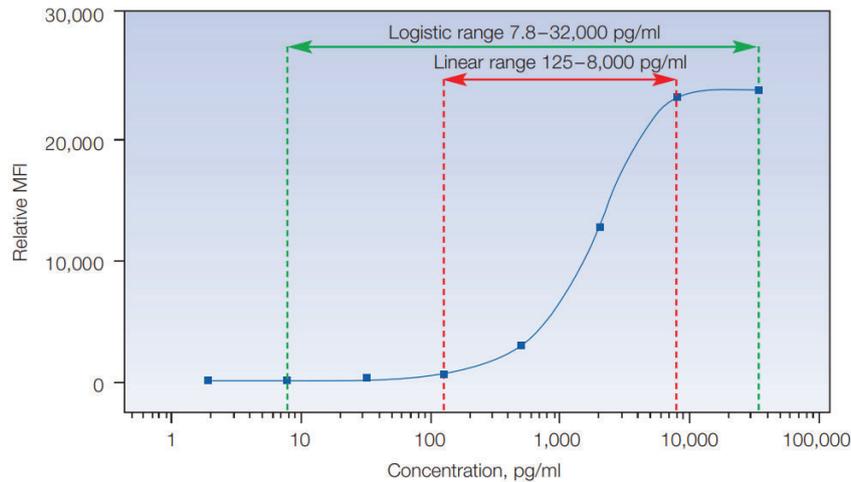


Figura 51: Rango dinámico para los modelos estadísticos lineal y logístico. Imagen extraída de [83].

El software, además de emplear los estándares de referencia para construir el modelo estadístico, también los utiliza para hacer un análisis conocido como **Standards-recovery** o **Backcalculation**. Este análisis consiste en calcular los valores de concentración de los estándares, una vez que la regresión fue realizada. Los valores calculados son luego empleados para calcular los porcentajes de recuperación según la **Ecuación 15**. En este sentido es muy similar al *spike-and-recovery* pero en este caso con las muestras estándar en vez de con las muestras incógnita. Normalmente se acepta que los valores de recuperación del *backcalculation* estén entre un 70 y un 130% [83]. Como se puede ver en la **Tabla 7**, la amplia mayoría de los valores están dentro de este rango salvo los dos valores más bajos de concentración.

Tabla 7: Resultados de los Standards-recovery para cada uno de los estándares. El porcentaje de recuperación se representa en la última columna

Calibrator	Conc.	Wells	Raw	SEM	Backfit	Recovery %
• Standard1	75	A1	1.32	0.00705	62.41	83.22
		B1	1.31		46.45	61.93
• Standard2	37.5	A2	1.28	0.0174	30.99	82.64
		B2	1.31		53.4	142.4
• Standard3	18.75	A3	1.25	0.00765	23	122.7
		B3	1.23		20.19	107.7
• Standard4	9.375	A4	1.11	0.00045	9.716	103.6
		B4	1.11		9.677	103.2
• Standard5	4.688	A5	0.878	0.00745	4.266	91
		B5	0.893		4.465	95.24
• Standard6	2.344	A6	0.651	0.0261	2.192	93.51
		B6	0.703		2.552	108.9
• Standard7	1.172	A7	0.451	0.0158	1.152	98.29
		B7	0.482		1.29	110
• Standard8	0.5859	A8	0.277	0.0251	0.5086	86.79
		B8	0.328		0.6789	115.9
• Standard9	0.293	A9	0.208	0.0058	0.2864	97.75
		B9	0.196		0.2503	85.44
• Standard10	0.1465	A10	0.138	0.0223	0.06644	45.36
		B10	0.182		0.2072	141.4
• Standard11	0.07324	A11	0.123	0.0206	0.01483	20.25
		B11	0.164		0.1509	206.1

La elección de un tipo de ajuste sobre otro depende de diversas variables. Entre ellas, se encuentra la cantidad de estándares disponibles. Para el caso del ajuste logístico se requieren como mínimo 6 puntos, mientras que para el ajuste lineal con más de tres es suficiente. Sin embargo, es importante destacar que a medida que se incrementa la cantidad de determinaciones, también lo hace la precisión del análisis en ambos modelos. Otra de las ventajas del ajuste lineal es su simpleza de análisis. Sin embargo, la regresión logística es capaz de arrojar resultados de cuantificación de alta precisión a lo largo de un rango dinámico mucho más amplio, siendo ésta una de sus principales ventajas frente al método lineal [83].

En la **Tabla 8** se pueden ver los distintos valores de los porcentajes de recuperación de los *spike-and-recovery* de nuestro ensayo final, empleando cada uno de los modelos estadísticos. Como se puede ver, la amplia mayoría de los valores de recuperación se encuentra en el rango 70-130%. Por otro lado, es interesante remarcar que el análisis de los datos mediante el ajuste lineal y el logístico arrojó valores similares, lo cual indica la fortaleza del ensayo para este tipo de determinaciones.

Tabla 8: Porcentaje de recuperación de las distintas muestras de bioprocesos (*spike-and-recovery*)

Muestra de bioproceso	Porcentaje de recuperación Ajuste lineal (%)	Porcentaje de recuperación Modelo logístico 4PL (%)
RBD Expression Medium	126,58	130,6
RBD Expression Medium <i>condicionado</i>	161,5	161,45
RBD en DMEM 10% SFB	97,35	105,4
RBD en DMEM 2% SFB	109,7	116,85
RBD en medio basal salino ( <i>P. pastoris medium</i> )	188,04	183,2
RBD en LB+IPTG	126,35	130,9

En su conjunto, estos resultados indican que hemos podido desarrollar satisfactoriamente una metodología que permite realizar una cuantificación precisa de RBD en muestras complejas de bioprocesos. En una próxima etapa del desarrollo, se abordará la determinación de parámetros tales como la *repetitibilidad* (repetición del ensayo en las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto), la *precisión intermedia* (relacionada a la repetición del ensayo por otro analista dentro del mismo laboratorio) y la *reproducibilidad* (la repetición del ensayo inter-laboratorio) [54].

## Discusión

A lo largo de este trabajo, se ha podido desarrollar satisfactoriamente un ensayo de cuantificación del dominio RBD de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2. Dicho ensayo alcanza niveles de sensibilidad menores al ng/ml, muy similares a los encontrados en los kits disponibles comercialmente [80]. Adicionalmente, se ha demostrado que el ensayo es apto para la cuantificación del dominio RBD en muestras de bioprocesos semejantes a las encontradas en la industria biotecnológica, las cuales suponen matrices complejas. Sin dudas, esto dota al ensayo de un alto valor agregado, ya que permitirá la cuantificación de la proteína recombinante presente en muestras de sobrenadante del cultivo, sin la necesidad de purificarla. Esta característica es de gran utilidad para hacer un seguimiento exhaustivo del nivel de productividad alcanzado durante el bioproceso (IPC: *In-Process Control*), además de constituir una herramienta poderosa para su optimización. Por ejemplo, tomando alícuotas del sobrenadante a distintos tiempos y bajo distintos tratamientos, es posible emplear el ELISA para encontrar las mejores condiciones que lleven a los mejores rendimientos en la producción de la proteína.

Como es sabido, existen otras metodologías capaces de cuantificar proteínas a partir de muestras de procesos, tales como densitometría de geles de SDS-PAGE y cromatografía líquida de alta *performance* (HPLC). Sin embargo, el ELISA es superador en múltiples aspectos. En cuanto a la cuantificación por densitometría de geles SDS-PAGE, la técnica se limita a los casos en los que la proteína tiene un peso molecular marcadamente distinto del peso de las demás proteínas del cultivo. Además, el límite inferior de cuantificación es alto y la precisión es baja producto de distintas variables como la siembra del gel, la migración electroforética, entre otras [37]. Alternativamente, la cuantificación de proteínas a partir de muestras complejas por HPLC se limita a la existencia de las columnas analíticas que soporten las altas presiones necesarias para resolver el producto dentro de la matriz en la que se encuentra. En el caso particular de las columnas tipo IMAC para la cuantificación de proteínas con tag de histidinas, estas columnas existen [40] [41], pero su costo es muy elevado en comparación con un ELISA cuantitativo [86]. En este sentido, el ELISA de cuantificación otorga la posibilidad de cuantificar proteínas a partir de sobrenadantes de cultivo con bajos límites de cuantificación y de forma precisa y accesible.

Esta capacidad del ensayo de reconocer al analito de interés dentro de matrices complejas despierta el interrogante de si el ensayo sería capaz de reconocer RBD dentro de muestras biológicas. Si bien es cierto que la validación del método se realizó empleando matrices de bioprocesos, nada indicaría que el ensayo no sería capaz de reconocer la muestra dentro de

matrices biológicas. Para comprobar esto, habría que hacer una validación de esta capacidad tomando un número muy importante de muestras positivas y negativas para SARS-CoV-2, de manera de poder determinar los distintos parámetros del ensayo que serán, muy probablemente, distintos al ensayo tal cual fue pensado. Esto sería así porque una matriz biológica es, desde múltiples puntos de vista, sustancialmente más compleja y supone la necesidad de demostrar que no hay reactividad cruzada contra otras proteínas de la muestra ni contra otros antígenos de patógenos relacionados [87]. Ya existen kits de cuantificación para el antígeno que han sido validados para muestras biológicas, que están disponibles comercialmente [88] [86].

El desarrollo de un ELISA de cuantificación en formato Sándwich, como el de este trabajo, exige que se generen un par de mAbs que reconozcan al antígeno con alta afinidad pero, además, que lo hagan contra epitopes distintos y no solapados, de manera que no haya impedimento estérico en el reconocimiento simultáneo del antígeno [51]. Por este motivo, se planteó la necesidad de generar un nuevo set de anticuerpos monoclonales adicionales a los obtenidos previamente por el laboratorio, de manera de tener una probabilidad más alta de obtener un buen par de mAbs que reconozcan a RBD de forma simultánea. Inicialmente, se pudieron obtener 3 nuevas líneas productoras de anticuerpos empleando a Alum como adyuvante en lugar del adyuvante de Freund, empleado en la campaña previa del laboratorio. Lamentablemente, luego de una serie de pasaje, uno de los clones perdió reactividad (23A9AL) y por lo tanto el desarrollo se continuó con los 5 mAbs restantes. La pérdida de productividad de anticuerpos por parte de hibridomas es algo relativamente habitual y puede tener múltiples causas, muchas de ellas no del todo comprendidas. En primer lugar, dada la alta inestabilidad genética de las células de mieloma, se han visto variaciones en el número de cromosomas que podrían explicar la pérdida de los genes que codifican para los mAbs [89]. Por otro lado, también se ha visto que los medios *libres de suero* suelen mejorar la estabilidad de las líneas productoras de anticuerpos [90]. Por lo tanto, eventualmente se podría reclonar el Hb23 (que se encuentra criopreservado en nitrógeno líquido) y hacerlo en un medio alternativo.

Una de las razones por las que el SARS-CoV-2 sigue siendo motivo de preocupación a nivel global, es porque el virus ha logrado desarrollar mutaciones que han generado nuevas olas de infección a través de las llamadas variantes de preocupación (VOC – por *Variants of Concern*). Como virus de RNA de cadena positiva, la frecuencia de aparición de mutaciones es bastante alta producto de diversos mecanismos evolutivos, entre los que se encuentran la baja fidelidad de las RNA

polimerasas dependientes de RNA por la nula o baja capacidad *proof-reading*<sup>6</sup> de las mismas [91] [92]. Interesantemente, estos mecanismos parecen operar de manera diferencial en las distintas regiones del genoma viral [93], y muchas de las mutaciones de las VOC han aparecido sobre el dominio RBD, en sitios que aumentan la afinidad de la interacción con ACE-2, o bien en sitios que le permiten el escape del sistema inmune [21]. La variante Ómicron, una de las variantes con mayor tasa de mutación hasta el momento, posee un total de 15 mutaciones puntuales sobre el dominio RBD que llevan a una interacción de mucha mayor afinidad con ACE-2 [94] [95]. Esta situación despertó la necesidad de la comunidad científica internacional de incorporar a las nuevas variantes en el rediseño de las distintas estrategias biotecnológicas de combate contra la pandemia. Por ejemplo, el 12 de septiembre del corriente año, la Agencia Europea de Medicina (EMA) emitió un comunicado en el cual se recomendaba la aprobación de una vacuna de la firma Pzifer/Biontech™ adaptada a la variante Omicron [96]. Es de esperar que lo mismo ocurra con otras tecnologías empleadas en la producción de vacunas, incluidas las vacunas de proteína a subunidad, así como los métodos de detección y diagnóstico viral. De hecho, ya existen métodos de cuantificación de RBD similares al descrito en este trabajo que han sido validados para la cuantificación de distintas variantes de preocupación [97]. En este escenario, sería muy interesante evaluar si el ensayo de cuantificación desarrollado en este trabajo puede ser utilizado en las producciones de RBD recombinante de nuevas VOC. Esta aplicación requerirá una validación del método similar a la ya realizada, en la cual se empleará como estándar al dominio RBD con sus correspondientes mutaciones. Actualmente, en nuestro grupo se está trabajando activamente en la validación de este ensayo para la variante Ómicron, la cual sigue siendo la cepa de mayor circulación a nivel poblacional en nuestro país, según el Ministerio de Salud de la Nación [98].

Alternativamente, el mapeo epitópico sería una herramienta de mucho valor dado que, si se supiera exactamente el sitio de reconocimiento de los anticuerpos utilizados en el ensayo, esto permitiría predecir si los mismos serían capaces de unirse a variantes de nuevas de RBD (como Ómicron u otras que puedan surgir en el futuro). Adicionalmente, el mapeo del sitio de reconocimiento de nuestros mAbs anti-RBD brindaría información valiosa para la determinación de la potencial utilización de nuestro ensayo para la cuantificación de moléculas de RBD producidas por otros sistemas de expresión, en los que se generan patrones de glicosilación diferentes a los producidos en células de mamíferos. Por ejemplo, si el mapeo epitópico indica que el sitio de reconocimiento de los anticuerpos del ensayo no involucra glicanos, esto

---

<sup>6</sup> La capacidad *proof-reading* de las polimerasas hace referencia a su capacidad de corregir errores en la incorporación de nucleótidos a través de su actividad exonucleasa 3'→5'.

implicaría *a priori* una ventaja en términos del reconocimiento del antígeno expresado en sistemas no mamíferos. La resolución de la estructura tridimensional del complejo antígeno:anticuerpo es uno de los abordajes posibles para realizar un mapeo epitópico [44]. Por esta razón, actualmente, en el grupo se está trabajando en colaboración con un laboratorio de Estados Unidos para la determinación de la estructura tridimensional del complejo de los anticuerpos del ensayo con RBD, empleando la metodología de criomicroscopía electrónica (cryo-EM). Esta metodología permite la elucidación estructural de macromoléculas de más de 300 kDa con una resolución del orden de los 3Å [99] y ya ha sido utilizada para el mapeo epitópico de distintas inmunoglobulinas [100] [101].

En línea con esto, adicionalmente, se está trabajando en la caracterización de la afinidad de las biomoléculas del ensayo. Como es sabido, la afinidad es uno de los parámetros más importantes a determinar de un anticuerpo sobre todo cuando se trata de un inmunoensayo, dado que la afinidad tendrá una íntima relación con la capacidad del mismo de detectar adecuadamente el analito. Por ejemplo, en un ensayo tipo ELISA es necesario que el reconocimiento sea con alta afinidad de forma tal que se puedan detectar cantidades pequeñas del antígeno y que la interacción antígeno-anticuerpo resista los pasos de los lavados [45]. Se han desarrollado distintas estrategias para el cálculo de las  $K_D$ . Una de las estrategias más ampliamente utilizadas hace uso del fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (SPR), metodología disponible en una serie de equipos Biacore®(GE Healthcare). Brevemente, esta metodología permite analizar y medir en tiempo real la interacción entre dos biomoléculas sin la necesidad de marcarlas [102]. En el grupo, se está trabajando en la determinación de la afinidad de los anticuerpos por RBD empleando esta metodología.

Como se puede ver, el epítipo de un anticuerpo cobra una vital importancia en los inmunoensayos como el descrito en este trabajo porque puede significar la utilidad o no del mismo para otras aplicaciones. Por este motivo, el diseño racional en el desarrollo de los anticuerpos monoclonales puede jugar un rol muy importante. Por ejemplo, en este trabajo, se ha demostrado que el empleo de adyuvantes con características fisicoquímicas disímiles ha permitido montar respuestas humorales diferenciales en los ratones inmunizados, aumentando las chances de obtener anticuerpos que reconozcan epítipes continuos y/o discontinuos en función del adyuvante empleado. Distintos estudios estructurales han mostrado que la conformación del antígeno dentro de la formulación se ve fuertemente influida por la naturaleza del adyuvante [48]. Por ejemplo, se ha visto que en las formulaciones con emulsiones de aceites (como el adyuvante de Freund) la estructura tanto secundaria como terciaria del antígeno se ve alterada notablemente [48], lo que puede afectar las especificidades de los anticuerpos

generados haciendo que el reconocimiento del antígeno esté más orientado hacia epítopes lineares o continuos que hacia epítopes conformacionales o discontinuos [49]. En cambio, en las sales de hidróxidos y fosfatos de aluminio trivalente (Alum), los mecanismos de interacción, si bien no están del todo dilucidados, involucran una adsorción del antígeno sobre la superficie del adyuvante que involucra interacciones electrostáticas, hidrofílicas y de intercambio químico (sustituciones) [50]. Esta adsorción podría afectar la estructura y la estabilidad de los antígenos, lo que en última instancia influye en la cinética de degradación y en la inmunogenicidad de los mismos [103]. En un trabajo reciente se demostró, mediante estudios de dicroísmo circular, que los cambios en la estructura secundaria de la proteína OVA adsorbida sobre hidróxido de aluminio no se ve afectada en grandes niveles [50]. Sin embargo, los efectos de la adsorción sobre la estabilidad deben ser estudiados para cada caso particular dado que dependen de la naturaleza fisicoquímica del antígeno [104]. En este trabajo, al emplear Alum como adyuvante, se vio una clara orientación de la respuesta humoral hacia epítopes discontinuos. Este diseño racional en la elección del adyuvante a utilizar puede resultar muy importante si, por ejemplo, se quieren obtener anticuerpos con potencial neutralizante en donde mantener la conformación nativa del antígeno proteico es clave [105]. En este trabajo, el empleo de dos adyuvantes tan distintos fue motivado por el hecho de querer obtener dos anticuerpos que reconozcan epítopes distintos a pesar de que, finalmente, los dos anticuerpos seleccionados para el ensayo final resultaron ser ambos de la campaña de inmunización de Alum.

Este diseño racional en la administración del antígeno bien puede utilizarse para nuevas aplicaciones. Por ejemplo, si se quisieran obtener anticuerpos que reconozcan a la proteína en su estado nativo exclusivamente, pero no en sitios que involucren glicosilaciones (para evitar incompatibilidades con otros sistemas de expresión), podría pensarse en un pre-tratamiento del antígeno con PNGasa F, una enzima encargada de deglicosilar a las proteínas, y su coadministración posterior con un adyuvante como el Alum.

Si bien nuestro método fue evaluado en su capacidad de cuantificar RBD, cabe aclarar que para poder ser transferido a la industria (o más aún, ser comercializado), es necesaria una validación más exhaustiva que incluya diversos atributos analíticos exigidos. Por ejemplo, según la Farmacopea Argentina, los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de los principios activos en productos farmacéuticos se circunscriben en la Categoría I [54] (en donde podría enmarcarse el ensayo de este trabajo). En esta categoría se exigen atributos como la exactitud, la precisión, la especificidad y la linealidad [54]. Si bien algunos de estos parámetros fueron determinados en la prueba de concepto realizada (como la linealidad, por ejemplo), es cierto que es menester la repetición del ensayo para una mejor

determinación de los mismos. Por otro lado, la precisión del ensayo no fue calculada. La precisión del ensayo, según la Farmacopea, puede ser determinada a tres niveles: la repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad. En el primer caso, es necesaria la repetición del ensayo en las mismas condiciones en las que fue realizado, para evaluar la variación en los resultados obtenidos. La precisión intermedia también evalúa la variabilidad de los resultados obtenidos, pero en este caso empleando un analista distinto dentro del mismo laboratorio. Finalmente, la reproducibilidad involucra la evaluación de la variación en los resultados del ensayo a nivel inter-laboratorio. Como se puede ver, la validación analítica completa del ensayo involucra un trabajo colaborativo y exhaustivo, sobre el que es necesario continuar a partir de los resultados aquí expuestos. De hecho, actualmente parte de estos ensayos se están llevando adelante por otros integrantes de nuestro grupo.

El dominio RBD recombinante, aún hoy, sigue siendo un bioinsumo clave de la industria biotecnológica en el manejo de la pandemia de COVID-19 [6] [5], y Argentina no es la excepción [23] [26]. Esta tendencia, además, continuará en ascenso. Al 30 de septiembre de 2022, existen 172 vacunas que están en ensayos clínicos, de las cuales más de un 30% emplean la tecnología de proteína a subunidad [25], constituyéndose como la tecnología más empleada entre los candidatos vacunales. Una plétora de estos candidatos utiliza al dominio RBD o a distintos fragmentos de la proteína Spike que contienen a dicho dominio. De hecho, entre estos candidatos, se encuentra la vacuna argentina 'ARVAC-Cecilia Grierson, desarrollada por la Universidad Nacional de San Martín y el CONICET, que requiere la producción de RBD de forma recombinante [26]. Por este motivo, el desarrollo de un ensayo de cuantificación como el descrito en este trabajo resulta de particular interés, no sólo por sus características remarcables como la sensibilidad, especificidad y costos, sino también porque el país, hasta donde conocemos, no cuenta con desarrollos nacionales como este.

## Conclusiones

Se pueden destacar distintas conclusiones del desarrollo de este trabajo. Entre ellas:

1. Se ha podido producir y purificar a las proteínas recombinantes necesarias para el inmunoensayo a partir del sobrenadante de los cultivos de células de mamífero adherentes (HEK293T) y en suspensión (Expi293F™). Además, a los efectos de aumentar los rendimientos y la escalabilidad, se consiguió adaptar a las Expi293F™ a crecer en un medio más económico.
2. Se logró desarrollar un método de screening para evaluar la reactividad IgG poli o monoclonal dirigida contra epitopes discontinuos de RBD.
3. Se inmunizaron ratones empleando Alum como adyuvante, consiguiendo orientar la respuesta humoral de los mismos hacia la proteína en su estado nativo exclusivamente.
4. A partir de los ratones inmunizados, se extrajeron los linfocitos B y se los fusionó con células de mieloma, logrando obtener hibridoma productores de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epitopes discontinuos de RBD. Dichos hibridomas pudieron ser clonados y criopreservados.
5. Se pudo purificar y caracterizar (parcialmente) a los anticuerpos monoclonales obtenidos contra epitopes discontinuos de RBD (bajo el plan de Alum) y a los anticuerpos obtenidos previamente por el laboratorio (bajo el plan del adyuvante de Freund).
6. A partir del total de 5 anticuerpos monoclonales disponibles, se determinó cuáles eran los dos más adecuados para la realización del ensayo en su formato Sándwich.
7. Se puso a punto satisfactoriamente el ensayo, determinando las concentraciones óptimas de los anticuerpos de detección y captura y de la estreptavidina acoplada a la enzima HRP.
8. Se validó el uso del ensayo para cuantificar muestras de RBD contenidas en muestras complejas empleadas en distintos bioprocesos habituales.

Como conclusión general, en este trabajo se ha conseguido desarrollar un ELISA de cuantificación del dominio RBD de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2 con niveles de sensibilidad menores al ng/ml. Adicionalmente, se ha conseguido que el ensayo sea capaz de cuantificar en forma precisa a la proteína RBD en las matrices empleadas en bioprocesos industriales. Este hito constituye, hasta donde conocemos, el primer desarrollo de un ensayo con estas características en nuestro país. Actualmente, se está trabajando en la validación analítica del ensayo, además de en su aplicación para la cuantificación de RBD recombinante

producida en otros sistemas de expresión y proteínas derivadas de nuevas variantes de preocupación. Los resultados obtenidos hasta el momento son alentadores.

## Bibliografía

1. H. Esakandari, M. Nabi-Afjadi, J. Fakkari-Afjadi y N. Farahmandian, «A comprehensive review of COVID-19,» *Biological Procedures Online*, 2020.
2. World Health Organization, «WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020,» WHO, Geneva, 2020.
3. W. H. Organization, «WHO COVID-19 Dashboard,» [En línea]. Available: <https://covid19.who.int/>. [Último acceso: 08 Junio 2022].
4. B. S. W. M. C. R. C. P. Chen Z, «Genomic and evolutionary comparison between SARS-CoV-2 and other human coronaviruses,» *Journal of Virological Methods*, p. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114032>, 2021.
5. H. Yang y Z. Rao, «Structural biology of SARS- CoV-2 and implications for therapeutic development,» *Nature Reviews Microbiology*, vol. 19, nº <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00630-8>, pp. 685-700, 2021.
6. S. H. Safiabadi Tali, J. LeBlanc, Z. Sadiq, O. D. Oyewunmi, C. Camargo, B. Nikpour, N. Armanfard, S. Sagan y S. Jahanshahi-Anbuhi, «Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection,» *ASM Journals. Clinical Microbiology Reviews*, vol. 34, nº 3, 2021.
7. P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stadler y V. Thiel, «Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2,» *Nature Reviews Microbiology*, vol. 19, nº <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>, p. 155–170 , 2021.
8. K. Bhattacharya, N. Bhattacharya y A. S. Bhattacharya, «The Discovery of Coronavirus – An Interesting Journey,» *Galician Medical Journal*, vol. 28, nº 3, pp. 1-3, 2021.
9. Y. Huang, C. Yang, W. Xu y S.-w. Liu, «Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19,» *Springer Nature*, vol. 41, pp. 1141-1149, 2020.
10. M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Kruger y T. Herrler, «SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor,» *Cell*, vol. 181, pp. 271-280, 2020.
11. F. Saponaro, G. Rutigliano, S. Sestito y L. Bandini, «ACE2 in the Era of SARS-CoV-2: Controversies and Novel Perspectives,» *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 7, nº 588618, 2020.
12. R. Henderson, R. Edwards, K. Mansouri, K. Janowska, V. Stalls, S. M. C. Gobeil, M. Kopp, D. Li, R. Parks, A. L. Hsu, M. J. Borgnia, B. Haynes y P. Acharya, «Controlling the SARS-CoV-2 spike glycoprotein conformation,» *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 27, pp. 925-933, 2020.

13. J. Lan, J. Ge, J. Yu, S. Shan, H. Zhou, S. Fan, Q. Zhang, X. Shi, Q. Wang, L. Zhang y X. Wang, «Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor,» *Nature*, vol. 581, pp. 215-220, 2020.
14. J. Yang, S. Petitjean, M. Koehler, Z. Qingrong y A. Dumitru, «Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor,» *Nature Communication*, vol. 11, 2020.
15. J. Shang, Y. Wan, C. Luo, G. Ye, Q. Geng, A. Auerbach y F. Li, «Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 117, nº 21, pp. 11727-11734, 2020.
16. X. Zhao, H. Chen y H. Wang, «Glycans of SARS-CoV-2 Spike Protein in Virus Infection and Antibody Production,» *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 8, nº 629873, 2021.
17. A. Sette y S. Crotty, «Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19,» *Cell*, vol. 184, nº 4, pp. 861-880, 2021.
18. N. Suryadevara, S. Shrihari, P. Gilchuk, L. Van Blargan y E. Binshtein, «Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein,» *Cell*, vol. 184, nº 9, pp. 2316-2331, 2021.
19. A. Abbas, A. Lichtman y S. Pillai, *Inmunología Celular y Molecular*, Novena ed., Barcelona: Elsevier, 2018.
20. A. Wagner, A. Guzek, J. Ruff, J. Jasinska, U. Scheikl, I. Zwazl, M. Kundi, H. Stockinger, M. Farcet, T. Kreil, E. Hoeltl y U. Wiedermann, «Neutralising SARS-CoV-2 RBD-specific antibodies persist for at least six months independently of symptoms in adults,» *Nature Communications Medicine*, vol. 1, nº 13, 2021.
21. A. Winger y T. Caspari, «The Spike of Concern—The Novel Variants of SARS-CoV-2,» *Viruses*, vol. 13, nº 6, 2021.
22. A. Singh y V. Gupta, «SARS-CoV-2 therapeutics: how far do we stand from a remedy?,» *Pharmacological Reports*, vol. 73, pp. 750-768, 2021.
23. V. Zylberman, S. Sanguineti, A. Pontoriero, S. V. Higa, M. L. Cerutti, S. M. Morrone Seijo, R. P. Pardo, L. Muñoz, M. E. Acuña Intieri, V. A. Alzogaray y Ava, «Development of a hyperimmune equine serum therapy for COVID-19 in Argentina,» *Medicina (Buenos Aires)*, vol. 80, pp. 1-6, 2020.
24. W. B. E. N. M. C. S. V. Z. L. M. M. D. G. L. J. F. G. V. A. B. F. C. F. G. Gustavo Lopardo, «RBD-specific polyclonal F(ab')<sub>2</sub> fragments of equine antibodies in patients with moderate to severe COVID-19 disease: A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled, adaptive phase 2/3 clinical trial.,» *eClinical Medicine*, vol. 34, nº 100843, 2021.
25. World Health Organization, «COVID-19 vaccine tracker and landscape,» WHO, Geneva, 2022.
26. L. Coria, L. Saposnik, C. Puelbas Castro, E. Castro, L. Bruno, W. Stone, P. Perez, M. Darriba, L. Chemes, J. Alcain, I. Mazzitelli, A. Varese, M. Salvatori, A. Auguste, D. Alvarez, K. Pasquevich y J. Cassataro, «A Novel Bacterial Protease Inhibitor Adjuvant in RBD-Based COVID-19 Vaccine Formulations Containing Alum

Increases Neutralizing Antibodies, Specific Germinal Center B Cells and Confers Protection Against SARS-CoV-2 Infection in Mice,» *Frontiers in Immunology*, vol. 13, nº 844837, 2022.

27. A. A.-C. Consortium, «Structural and functional comparison of SARS-CoV-2-spike receptor binding domain produced in *Pichia pastoris* and mammalian cells,» *Scientific reports*, vol. 10, nº 211779, 2020.
28. A. J. Berndt, T. N. Smalley, B. Ren, R. Simkovsky, A. Badary, A. E. Sproles, F. J. Fields, Y. Torres-Tiji, V. Heredia y S. P. Mayfield, «Recombinant production of a functional SARS-CoV-2 spike receptor binding domain in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*,» vol. 16, nº 11, 2021.
29. T. Mamedov, D. Yuksel, M. Ilgin, I. Gurbuzaslan, B. Gulec, H. Yetiskin, M. A. Uygut, S. Terkis, I. Pavel, A. Ozdarendeli, G. Mammadova, D. Say y G. Hasanova, «Plant-Produced Glycosylated and In Vivo Deglycosylated Receptor Binding Domain Proteins of SARS-CoV-2 Induce Potent Neutralizing Responses in Mice».
30. R. Fujita, M. Hino, T. Ebihara, T. Nagasato, A. Masuda, J. M. Lee, T. Fujii, H. Mon, K. Kakino, R. Nagai, M. Tanaka, Y. Tonooka, T. Moriyama y T. Kusakabe, «Efficient production of recombinant SARS-CoV-2 spike protein using the baculovirus-silkworm system,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 529, nº 2, pp. 257-262, 2020.
31. J. Mehalko, M. Drew, K. Snead, J.-P. Denson, T. T. V. Wall, K. Sadtler, S. Messing, W. Gillette y D. Esposito, «Improved production of SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain (RBD) for serology assays,» *Protein Expr Purif*, vol. 179, nº 105802, 2021.
32. M. D. March, M. Terdoslavich, P. S. G. C. P. A. M. Marcello, Skoko y d. M. A. «Expression, purification and characterization of SARS-CoV-2 spike RBD in ExpiCHO cells,» *Protein Expression and Purification*, vol. 194, nº 106071, 2022.
33. Gibco, «Expi293™ Expression System User Guide,» Thermo Scientific, 2020.
34. I. Freshney, *Culture of Animal Cells*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2010.
35. J. Kellermann, «Aminoacid analysis,» de *Bioanalytics: Analytical Methods and Concepts in Biochemistry and Molecular Biology*, Weinheim, John Wiley & Sons, 2018, pp. 301-311.
36. L. Fischer y T. Stressler, «Protein Determination,» de *Bioanalytics: Analytical Methods and Concepts in Biochemistry and Molecular Biology*, Weinheim, John Wiley & Sons, 2018, pp. 23-33.
37. K. H. B.-Z. B. B. C. A. L. C. F. L. Alonso Villela SM, «A protocol for recombinant protein quantification by densitometry,» *Microbiologyopen*, vol. 9, nº 6, pp. 1175-1182, 2020.
38. A. S. E. N. Moshe Tal, «Why Does Coomassie Brilliant Blue R Interact Differently with Different Proteins?,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 260, nº 18, pp. 9976-9980, 1985.
39. Cytiva, «Principles & Methodology Handbooks,» [En línea]. Available: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11495-pdf>. [Último acceso: 25 04 2022].

40. McCarthy, Tracy, Avdalovic y Pohl, «High Resolution Protein and Peptide Separations on a Nanoengineered Analytical IMAC Column,» [En línea]. Available: [https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CMD/posters/38887-LPN%201821\\_IMAC.pdf?\\_ga=2.127528206.2083078515.1664116459-43699129.1661974631](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CMD/posters/38887-LPN%201821_IMAC.pdf?_ga=2.127528206.2083078515.1664116459-43699129.1661974631). [Último acceso: 25 09 2022].
41. Thermo Scientific, «Thermo Scientific™ Columnas para LC ProPac™ IMAC-10,» [En línea]. Available: <https://www.fishersci.es/shop/products/propac-imac-immobilized-metal-affinity-columns/p-4523591>. [Último acceso: 25 09 2022].
42. R. P. Linke, «Immunological Techniques,» de *Bioanalytics: Analytical Methods and Concepts in Biochemistry and Molecular Biology*, Weinheim, John Wiley & Sons, 2018, pp. 63-106.
43. K. Murphy y C. Weaver, *Janeway's Immunobiology* 9th ed, New York: Garland Science, 2016.
44. J. Nilvebrant y J. Rockberg, «An Introduction to Epitope Mapping,» *Methods Molecular Biology*, vol. 1785, pp. 1-10, 2018.
45. L. Heinrich, N. Tissot, D. J. Hartmann y R. Cohen, «Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity,» *Journal of Immunological Methods*, vol. 352, nº 1, p. 13–22, 2010.
46. J. P. C. P. Bernard Glick, *Molecular Biotechnology* 4th Edition, Washington DC : ASM Press, 2010.
47. B. Pulendran, P. Arunachalam y D. Hagan, «Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants,» *Nature Reviews*, vol. 20, pp. 454-475, 2021.
48. C. Fox, R. Kramer, L. Barnes, Q. Dowling y T. Vedvick, «Working together: interactions between vaccine antigens and adjuvants,» *Therapeutic advances in vaccines*, vol. 1, nº 1, pp. 7-20, 2013.
49. M. L. Cerutti, J. Centeno, G. d. Prat-Gay y F. A. Goldbaum, «Antibody response to a viral transcriptional regulator,» *FEBS Letters*, vol. 534, pp. 202-206, 2003 Jan 16;534(1-3):202-6..
50. G. Guerrini, A. Vivi, S. Gioria, J. Ponti, D. Magri, A. Hoeveler, D. Medagliani y L. Calzolari, «Physicochemical Characterization Cascade of Nanoadjuvant–Antigen Systems for Improving Vaccines,» *Vaccines*, vol. 9, nº 6, pp. 1-13, 2021.
51. Thermo Fischer Scientific, «ELISA technical guide and protocols,» [En línea]. Available: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>. [Último acceso: 10 08 2022].
52. P. Weberd, O. Wendoloskiand y F. Salemme, «Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin,» *Science*, vol. 243, nº 4887, pp. 85-88, 1989.
53. B. F. Lisa Djavadi-Ohanian, «Chapter 10: The specificity of monoclonal antibodies for enzymes in solution vs immobilized on solid phases,» de *Immunochemistry of solid-phase immunoassay*, Florida, CRC Press, 1991, pp. 201-206.

54. ANMAT, Farmacopea Argentina 7ma Edición, Buenos Aires: ANMAT, 2003.
55. R. Minic y I. Zivkovic, «Optimization, Validation and Standardization of ELISA,» de *ELISA Test-Perspectives and Applications*, Intechopen, 2020.
56. F. Amanat, D. Stadlbauer, S. Strohmeier y F. Krammer, «A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans,» *Nature Medicine*, vol. 26, pp. 1033-1036, 2020.
57. QIAGEN, «QIAGEN® Plasmid Purification Handbook,» 2021.
58. Gibco, «Expi293™ Expression System. User Guide,» Thermo Scientific, 2020.
59. Expasy, «ProtParam,» [En línea]. Available: <https://web.expasy.org/protparam/>. [Último acceso: 03 10 2022].
60. Galfrè y Milstein, «Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures,» *Methods in Enzymology*, vol. 73, pp. 3-46, 1981.
61. Amersham Biosciences, «Affinity chromatography handbook. Principles and methods,» [En línea]. Available:  
[https://b3p.it.helsinki.fi/download/GE\\_Protein\\_Purification\\_Handbooks/Affinity\\_Chromatography\\_Handbook.pdf](https://b3p.it.helsinki.fi/download/GE_Protein_Purification_Handbooks/Affinity_Chromatography_Handbook.pdf). [Último acceso: Febrero 2022].
62. Sigma Aldrich, «Product Information: (+)-Biotin N-hydroxysuccinimide ester,» [En línea]. Available:  
<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/368/502/h1759pis.pdf>. [Último acceso: 9 Septiembre 2022].
63. European Collection of Authenticated Cell Cultures, «ECACC General Cell Collection: 293T,» [En línea]. Available:  
[https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refid=12022001&collection=ecacc\\_gc#:~:text=ECACC%20General%20Cell%20Collection%3A%20293T&text=Cell%20Line%20Description%3A,and%20a%20neomycin%20resistance%20gene..](https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refid=12022001&collection=ecacc_gc#:~:text=ECACC%20General%20Cell%20Collection%3A%20293T&text=Cell%20Line%20Description%3A,and%20a%20neomycin%20resistance%20gene..) [Último acceso: 11 09 2022].
64. Gibco, Cell Culture Basics Handbook, Thermo Scientific, 2020.
65. S. L. K. M. L. C. C. Baker, «Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery,» *Gene Therapy*, vol. 4, p. 773–782, 1997.
66. Sigma-Aldrich, «Imidazole BioUltra Hoja de Especificación,» [En línea]. Available:  
<https://www.sigmaaldrich.com/AR/es/specification-sheet/SIGMA/56749>. [Último acceso: 11 09 2022].
67. B. Matlock, «Assessment of Nucleic Acid Purity,» [En línea]. Available:  
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>. [Último acceso: 17 09 2022].

68. R. Yan, Y. Zhang, Y. Li, L. Xia, Y. Guo y Q. Zhou, «Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE-2,» *Science*, vol. 367, n° 6485, pp. 1444-1448, 2020.
69. Sigma-Aldrich, «EX-CELL CD HEK293 Viral Vector Medium Product Information,» Sigma-Aldrich, 2021.
70. S. Akbar, K. Sreeramulu y C. Sharma, «Tryptophan fluorescence quenching as a binding assay to monitor protein conformation changes in the membrane of intact mitochondria,» *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 48, p. 241–247, 2016.
71. P. Sindrewicz, X. Li, E. Yates, J. Turnbull, L.-Y. Lian y L.-G. Yu, «Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy reliably determines galectin-ligand interactions,» *Scientific Reports*, vol. 9, n° 11851, 2019.
72. Unchained Labs, «Differential Scanning Fluorimetry,» [En línea]. Available: <https://www.unchainedlabs.com/differential-scanning-fluorimetry/>. [Último acceso: 14 09 2022].
73. Sjöbring, Björck y Kastern, «Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, n° 1, pp. 399-405, 1991.
74. H. DeLisser, «Epitope Mapping,» de *Adhesion Protein Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 96*, Humana Press, 1999.
75. C. W. Tan, W. N. Chia, X. Qin, P. Liu, M. Chen, C. Tiu, Z. Hu, V. Chen, B. Young, W. R. Sia, Y.-J. Tan, R. Foo, Y. Yi, D. Lye, D. Anderson y L.-F. Wang, «A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction,» *Nature Biotechnology*, vol. 38, n° 9, pp. 1073-1078, Sept 2020.
76. R. Kohanski, «Biotinylation,» de *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Baltimore, 2013, pp. 226-228.
77. Thermo Scientific, «Overview of Protein Labeling,» [En línea]. Available: <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-labeling.html>. [Último acceso: 07 09 2022].
78. biotINK, «biotINK,» [En línea]. Available: [https://2016.igem.org/Team:LMU-TUM\\_Munich](https://2016.igem.org/Team:LMU-TUM_Munich). [Último acceso: 08 10 2022].
79. European Medicines Agency (EMA), «Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products,» EMA, London, Sept 1999.
80. Cusabio, «SARS-CoV-2 S1 RBD ELISA Kit,» [En línea]. Available: <https://www.cusabio.com/ELISA-Kit/Novel-Coronavirus-Spike-Glycoprotein-RBD--SARS-CoV-2-S1-RBD--ELISA-Kit-12928679.html>. [Último acceso: 01 10 2022].
81. J. Devore, Probabilidad y Estadística para ingeniería y ciencias, Mexico DF: CENGAGE Learning, 2012.
82. D. Harris, Análisis químico cuantitativo 3a edición, Barcelona: Reverté, 2016.

83. D. Davis, «Principles of Curve Fitting for Multiplex Sandwich Immunoassays,» Bio-Rad, California, s.f..
84. B.-J. Choi, «Statistical Analysis, Modeling, and Algorithms for Pharmaceutical and Cancer Systems,» University of South Florida, 2014.
85. MyAssays, «MyAssays,» [En línea]. Available: <https://www.myassays.com/>. [Último acceso: 20 09 2022].
86. Novus Biologicals, «SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) Spike RBD ELISA Kit (Colorimetric),» [En línea]. Available: [https://www.novusbio.com/products/sars-cov-2-omicron-b11529-spike-rbd-elisa-kit\\_nbp3-12861](https://www.novusbio.com/products/sars-cov-2-omicron-b11529-spike-rbd-elisa-kit_nbp3-12861). [Último acceso: 02 10 2022].
87. R. N. Fichorova, N. Richardson-Harman, M. Alfano, L. Belec, C. Carbonneil, S. Chen, L. Cosentino, K. Curtis, C. S. Dezzutti, B. Donoval, G. F. Doncel, M. Donaghay y J.-C. Grivel, «Biological and Technical Variables Affecting Immunoassay Recovery of Cytokines from Human Serum and Simulated Vaginal Fluid: A Multicenter Study,» *Analytical Chemistry*, vol. 80, nº 12, pp. 4741-4751, 2008.
88. Invitrogen, «Human SARS-CoV-2 RBD ELISA Kit - Product Information Sheet,» [En línea]. Available: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FEH492RB.pdf>. [Último acceso: 01 10 2022].
89. S. M. Nejad, H. Mozdarani, M. A. Shokrgozar y V. Farahat, «Chromosomal Variation in Three Human-Mouse Hybridoma Cell Lines after Various Passaging Intervals as Assessed with Two Different Staining Methods,» *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 11, nº 3, pp. 183-189, 2008.
90. N. Kessler, S. Bertrand y M. Aymard, «Stability of a murine hybridoma is dependent on the clonal line and culture media,» *In Vitro Cell Dev Biol*, vol. 29, pp. 203-207, 1993.
91. S. Duffy, «Why are RNA virus mutation rates so damn high?,» *PLoS Biology*, vol. 16, nº 8, 2018.
92. K. Peck y A. Lauring, «Complexities of Viral Mutation Rates,» *Journal of Virology*, vol. 92, nº 14, 2018.
93. A. Gorbalenya, L. Enjuanes, J. Ziebuhr y E. Snijdera, «Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome,» *Virus Research*, vol. 117, nº 1, pp. 17-37, 2006.
94. Y. S. H. X. Q. Y. Dandan Tian, «The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant,» *Journal of Medical Virology*, vol. 94, p. 2376-2383, 2022.
95. Y. Y. H. C. X.-D. S. H. L. Cecylia Lupala, «Mutations on RBD of SARS-CoV-2 Omicron variant result in stronger binding to human ACE2 receptor,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 590, pp. 34-41, 2022.
96. European Medicine Agency (EMA), «Adapted vaccine targeting BA.4 and BA.5 Omicron variants and original SARS-CoV-2 recommended for approval,» 12 09 2022. [En línea]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/news/adapted-vaccine-targeting-ba4-ba5-omicron-variants-original-sars-cov-2-recommended-approval>. [Último acceso: 01 10 2022].

97. KRISHGEN BioSystems, «GENLISA™ SARS-CoV-2 (Covid-19) (Wild Type+South African Variant) RBD Antigen Quantitative TITRATION ELISA,» [En línea]. Available: <https://www.krishgen.com/product/details/SARS-CoV-2-Wild-Type-South-African-Variant-RBD-Antigen-Quantitative-ELISA>. [Último acceso: 01 10 2022].
98. Ministerio de Salud, «COVID 19: Situación de las nuevas variantes SARS-CoV-2 en Argentina,» Junio 2022. [En línea]. Available: [https://www.argentina.gov.ar/sites/default/files/2022/06/vigilancia\\_genomica-se23.pdf](https://www.argentina.gov.ar/sites/default/files/2022/06/vigilancia_genomica-se23.pdf). [Último acceso: 01 10 2022].
99. J. W. X. Z. Z. Y. J.-C. Z. L. Z. H.-L. P. J. L. H.-W. W. Xiao Fan, «Single particle cryo-EM reconstruction of 52 kDa streptavidin at 3.2 Angstrom resolution,» *Nature Communications*, vol. 10, nº 2386, 2019.
100. T. Nguyen y J. Song, «Direct IgG epitope mapping on bacterial AB toxins by cryo-EM,» *STAR Protocols Cell*, vol. 2, nº 4, pp. 1-15, 2021.
101. M. Bianchi, H. L. Turner, B. Nogal, C. A. Cottrell, D. Oyen, M. Pauthner, R. Bastidas, R. Nedellec, L. E. McCoy, I. A. Wilson, D. R. Burton, A. B. Ward y L. Hangartner, «Electron-Microscopy-Based Epitope Mapping Defines Specificities of Polyclonal Antibodies Elicited during HIV-1 BG505 Envelope Trimer Immunization,» *Cell Immunity*, vol. 49, nº 2, pp. 288-300, 2018.
102. S. Hearty, P. Leonard y R. O’Kennedy, «Measuring Antibody–Antigen Binding Kinetics Using Surface Plasmon Resonance,» de *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Springer Science, 2012, pp. 411-442.
103. S. Scheiblhofer, J. Laimer, Y. Machado, R. Weiss y J. Thalhamer, «Influence of protein fold stability on immunogenicity and its implications for vaccine design,» *Expert Review of Vaccines*, vol. 16, nº 5, pp. 479-489, 2017.
104. V. Iyer, L. Hu, M. R. Liyanage, R. Esfandiary, C. Reinisch, A. Meinke, J. Maisonneuve, D. B. Volkin, S. B. Joshi y C. R. Middaugh, «Preformulation characterization of an aluminum salt-adjuvanted trivalent recombinant protein-based vaccine candidate against *Streptococcus pneumoniae*,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 101, nº 9, pp. 3078-3090, 2012.
105. G. P. A. D. K. P. J. Z. E. M. M. S. H. C. M. G. d. M. B. M. C. T. L. J. M. P. T. John Schardt, «Discovery and characterization of high-affinity, potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies via single B cell screening,» *Scientific Reports*, vol. 11, nº 20738, 2021.
106. J. Nieto-Torres, C. Verdiá-Báguena, J. Jimenez-Guardeño, J. Regla-Nava, C. Castaño-Rodríguez, R. Fernandez-Delgado, J. Torres, V. Aguilera y L. Enjuanes, «Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome,» *Virology*, vol. 485, nº <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.010>, pp. 330-339, 2015.
107. X. Lu, J. Pan, J. Tao y D. Guo, «SARS- CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN-  $\beta$  response by targeting initial step of IFN-  $\beta$  induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism,» *Virus Genes*, vol. 42, nº DOI: 10.1007/s11262-010-0544-x, pp. 37-45, 2011.

108. T. Sunil, «The Structure of the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Resembles the Sugar Transporter SemiSWEET,» *Pathogens and Immunity*, vol. 5, nº 1, pp. 342-363, 2020.
109. S. Beyerstedt, E. Barbosa Casaro y É. Bevilaqua Rangel, «COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection,» *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 40, pp. 905-919, 2021.
110. M. V. Sinigubova, N. A. Orlova, S. V. Kovnir, L. K. Dayanova y I. I. Vorobiev, «High-level expression of the monomeric SARS-CoV-2 S protein RBD 320-537 in stably transfected CHO cells by the EE1A1-based plasmid vector,» *PLOS*, vol. 16, nº 2, pp. 1-9, 2021.
111. R. Engel, B. Micheel y K. Hanack, «Three-dimensional cell culture approach for in vitro immunization and the production of monoclonal antibodies,» *Biomedical Materials*, vol. 17, nº 5, 2022.
112. Billiau y Matthys, «Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases,» *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 70, nº 6, pp. 849-860, 2001.
113. Center for Disease Control and Prevention (CDC), «Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS),» [En línea]. Available: <https://www.cdc.gov/sars/index.html>. [Último acceso: 24 05 2022].
114. L. Jorgensen, M. Van de Weert, C. Vermehren, S. Bjerregaard y S. Frokjaer, «Probing structural changes of proteins incorporated into water-in-oil emulsions,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 93, nº 7, pp. 1847-1859, 2004.

San Martín, 15 de diciembre de 2022

El presente manuscrito corresponde a la **versión final** de la Tesis de Licenciatura en Biotecnología de Miguel Angel Deriane, titulada “Desarrollo de un ELISA de cuantificación del dominio RBD de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2”. Esta versión ya fue revisada por los jurados correspondientes y no presentó ninguna observación por parte de los mismos.



---

Miguel Angel Deriane

Tesista



---

Dra. María Laura Cerutti

Directora



---

Dr. Diego Gabriel Nosedá

Co-director