UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D´ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

Desarrollo de metodologías de anclaje de anticuerpos basadas en reacciones de *click-chemistry*. Aplicación a la detección de marcadores cardíacos.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: ADRIÁN POVEDA ÚBEDA

TUTORES: MARÍA JOSÉ BAÑULS POLO
ÁNGEL MAQUIEIRA CATALÁ

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, 5 de Julio de 2016

Reserva de todos los derechos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi tutora **María José Bañuls** por haberme aceptado para llevar a cabo este proyecto, por su tiempo y su entera dedicación. También me gustaría darle las gracias dejarme formar parte del mundo de los biosensores, por haber aguantado, y por haberme transmitido sus conocimientos.

Como no, dar las gracias a todas las personas del **IDM** (Instituto de Desarrollo Molecular) tanto doctorados como doctorandos, en especial a Pilar Jiménez, por haberme guiado en el laboratorio, por haberme ayudado siempre que me haya hecho falta y por su buen humor.

También dar las gracias a mis compañeros de la carrera sin los cuales sería casi imposible estar hoy aquí. Por todas las horas de biblioteca, por todos los agobios, y sobre todo, por todos los momentos compartidos. Muchas gracias.

Por último, y no menos importante, dar las gracias a los de siempre, familia y amigos que siempre han estado ahí cuando les he necesitado y apoyándome en todas las decisiones que he tomado.

Desarrollo de metodologías de anclaje de anticuerpos basadas en reacciones de *click-chemistry*. Aplicación a la detección de marcadores cardiacos.

Resumen

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto europeo PHOCNOSIS (H2020-PHC-634013) que tiene como objetivo el desarrollo de un dispositivo de análisis *point-of-care* (POC), basado en diversos conceptos nanotecnológicos novedosos, para su aplicación en el diagnóstico precoz de enfermedades cardiovasculares. El diagnóstico pretende la detección rápida (<10 minutos), ultra-sensible (<1 ng/L), sin utilizar marcadores (*label-free*) y simultánea de diversos biomarcadores cardiacos de relevancia haciendo uso de una pequeña muestra de sangre del paciente (<100 µL). Para conseguir este objetivo, uno de los pasos claves es desarrollar métodos apropiados de inmovilización de los receptores específicos (anticuerpos) para los biomarcadores cardiacos seleccionados. Esta inmovilización ha de ser orientada, selectiva en las zonas sensoras del chip, y además permitir que el evento de bioreconocimiento se produzca lo más cerca posible de la superficie.

Este trabajo presenta la optimización de las metodologías de anclaje de los bioreceptores sobre el material que constituirá el transductor en el dispositivo nanofotónico final. Estas estrategias están basadas en la fotoinmovilización mediante el uso de reacciones de química *click* (reacción de acoplamiento tiol-eno). Todo el trabajo de optimización se ha hecho empleando formato *microarray* de fluorescencia y usando un sistema modelo. Así, este primer biosensor utiliza el sistema BSA (*bovine serum albumin*)-αBSA como modelo de anticuerpo policlonal. Distintos parámetros como el tipo de funcionalización de superficie, el tipo de anticuerpo a inmovilizar, el tiempo de irradiación y, el método de detección han sido optimizados. Dada la finalidad del proyecto (dispositivo comercial) se han realizado estudios similares con un segundo modelo, en este caso monoclonal, el sistema CRP (*C-reactive protein*)- αCRP, ya que por las ventajas que presentan los receptores de la aplicación final serán anticuerpos monoclonales.

Palabras clave: *microarray,* química *click,* reacción del tiol-eno, fotoinmovilización, BSA, CRP.

Abstract

This project is framed in the European Project PHOCNOSIS (H2020-PHC-634013), which aims the development of a point-of-care (POC) analytical device. It is based in many nanotechnology novel concepts, for its application in the early diagnosis of cardiovascular diseases. The diagnosis will be carried out by means of the fast (<10 minutes), ultra-sensitive (<1 ng/L) and label-free detection of multiple cardiac biomarkers, using a small volume of whole blood (<100 µL). To achieve this goal, one of the main steps is the development of suitable methods for the immobilization of specific receptors (antibodies) for the targeted cardiac biomarkers. This immobilization must be oriented and selective in the sensor areas of the chip, and although it must allow that the biorecognition takes place as close as possible to the surface.

The assignment presents the anchorage methodology improvement of the bioreceptors to the material that establish the nanophotonic-based device. These approaches are based in the photoimmbilization using *click*-chemistry reactions (thiol-ene reactions). The whole work was done using a fluorescence microarray methodologies and two model systems. In this way, the first biosensor is based on BSA (bovine serum albumin)-αBSA system as polyclonal antibody model. Many parameters have been optimized as the antibody fragment to be anchored, the irradiation time and the detection method. According to project's goal, many similar

experiments have been performed with the monoclonal system CRP (C-reactive protein)-αCRP, as in the final device the bioreceptors will be monoclonal antybodies.

Main words: microarray, *click*-chemistry, thiol-ene reaction, photoimmobilization, BSA, CRP.

Alumno: Adrián Poveda Úbeda

Valencia, julio de 2016

Tutores: María José Bañuls Polo

Ángel Maquieira Catalá

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

1. INTRODUCCIÓN A LA TECNOLOGÍA DE LOS *MICROARRAYS*…… 1
2. DEFINICIÓN DE *MICROARRAY*. TIPOS…… 1
3. ASPECTOS A TENER EN CUENTA EN LA FABRICACION DE UN *MICROARRAY*…… 2
   3.1 Elección de soportes. Tipos de superficie…… 2
   3.2 Elección de la sonda…… 3
   3.3 Formas de marcaje…… 4
   3.4 Métodos de inmovilización…… 5
      3.4.1 ***Inmovilización física***…… 5
      3.4.2 ***Inmovilización covalente***…… 5
         3.*4.2.*1 Inmovilización inespecífica…… 6
            3.*4.2.1.1 Química de las aminas*…… 6
            3.*4.2.1.2 Química del tiol*…… 6
            3.*4.2.1.3 Fotoinmovilización*…… 7
         3.4.2.2 Inmovilización de sitio específico…… 7
            3.4.2.2.1 Cicloadición de Diels-Alder…… 7
            3.4.2.2.2 Química "click"…… 7
            3.4.2.2.3 Ligación de α-oxo semicarbazonas…… 7
      3.4.3 **Inmovilización por bioafinidad**…… 8
4. LECTURA DEL *MICROARRAY.* DETECCIÓN…… 8
5. USO DE LAS REACCIONES FOTOINDUCIDAS PARA INMOVILIZAR PROTEINAS…… 9
   5.1 Uso de las reacciones del tiol-eno y tiol-ino para la inmovilización de proteínas…… 10
6. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS…… 11
7. CONTEXTO EN EL QUE SE DESARROLLA ESTE TFG. PROYECTO PHOCNOSIS…… 14

OBJETIVOS 16

MATERIALES Y MÉTODOS 17

1. REACTIVOS…… 17
2. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE…… 18
3. MÉTODOS…… 18
   3.1 Activación de la superficie de vidrio…… 18
   3.2 Funcionalización de la superficie de vidrio…… 18
   3.3 Marcaje de la BSA…… 19
   3.4 Protocolo de marcaje de la CRP…… 19
   3.5 Protocolo de obtención de fragmentos de anticuerpos…… 20
      3.5.1 ***Obtención de fragmentos a partir de la α-BSA***…… 20
         3.5.1.1 Producción de $F(ab')_2$ con Pepsina…… 20
         3.5.1.2 Producción de Half-IgG…… 20
         3.5.1.3 Producción de Fab con *Pierce™ Preparation Kit*…… 21
      3.5.2 ***Obtención de fragmentos a partir de la α-CRP***…… 21
         3.5.2.1 Producción de $F(ab')_2$ Pierce Mouse IgG_1 Fab and $F(ab')_2$ Micro Preparation Kit…… 21
   3.6 Caracterización de los fragmentos de IgG por electroforesis de proteínas…… 22
   3.7 Protocolo de impresión e inmovilización de los anticuerpos en el *microarray* y

reacción de reconocimiento con la proteína marcada..... 23
3.8 Lectura y análisis de detección..... 23

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 24

1. RESULTADOS DEL MARCAJE FLUORESCENTE DE LAS PROTEÍNAS A DETECTAR: ALBÚMINA DE SUERO BOVINA (BSA) Y PROTEÍNA C-REACTIVA (CRP)..... 24
2. PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA MODELO POLICLONAL BSA/ANTI-BSA..... 26
2.1 Optimización de la funcionalización de la superficie..... 26
2.2 Obtención de los fragmentos de anticuerpos y caracterización..... 27
2.3 Optimización del tiempo de irradiación..... 32
2.4 Estudio de la capacidad de reconocimiento del biomarcador..... 33
3. MODELO MONOCLONAL CRP/ANTI-CRP..... 34
3.1 Obtención de los fragmentos de anticuerpos..... 34
3.2 Optimización del tiempo de irradiación..... 35
3.3 Ensayo de especificidad..... 37

CONCLUSIÓN 38

BIBLIOGRAFÍA 39

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Esquema de un *microarray* de proteínas..... 1
Figura 2. Conceptos de los mecanismos de unión a las superficies en *microarrays* de proteínas y anticuerpos..... 3
Figura 3. Tipos de *microarrays* de proteínas..... 3
Figura 4. Superficies funcionalizadas con vinil sulfonas..... 7
Figura 5. Diferentes modalidades de fabricación de un *microarray*..... 8
Figura 6. Esquema de un sistema de detección similar al empleado en nuestro trabajo..... 9
Figura 7. Principales grupos empleados en la fotoinmovilización..... 10
Figura 8. Reacción del tiol-eno..... 10
Figura 9. Reacción del tiol-ino..... 11
Figura 10. Estructura de un anticuerpo (IgG) y sitios de corte para su fragmentación..... 12
Figura 11. Tipos de fragmentos de anticuerpos..... 13

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 12. Experimento y curva de calibrado de la BSA*..... 25
Figura 13. Recta de calibrado de la BSA*..... 25
Figura 14. Recta de la calibrado de la CRP*..... 26
Figura 15. Esquema del proceso de funcionalización de la superficie de vidrio mediante irradiación..... 26
Figura 16. Resultado de la derivatización de las superficies..... 27
Figura 17. Protocolo final de activación y funcionalización de superficies..... 27
Figura 18. Electroforesis de proteínas con NuPAGE Geles Bis-Tris..... 29
Figura 19. Experimento con chips..... 30
Figura 20. Experimento de optimización de variables (BSA)..... 30
Figura 21. Gráfica comparativa de intensidades de fluorescencia (BSA)..... 31
Figura 22. Electroforesis de proteínas con NuPAGE Geles Bis-Tris..... 31
Figura 23. Experimento de optimización del tiempo de irradiación (CRP)..... 32
Figura 24. Experimento con distintas concentraciones de BSA*..... 32
Figura 25. Experimento con distintas concentraciones de BSA*..... 33
Figura 26. Gráfica con los resultados de la optimización de variables (BSA)..... 33
Figura 27. Experimento llevado a cabo *over-night* (BSA)..... 33
Figura 28. Experimento de optimización de variables (CRP)..... 34
Figura 29. Experimento de optimización del tiempo de irradiación (CRP)..... 36
Figura 30. Experimento de lavados (CRP)..... 36
Figura 31. Experimento de optimización de variables (CRP)..... 37
Figura 32. Ensayo de especificidad (CRP)..... 37

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Técnicas de marcaje……. 5
Tabla 2. Grupos funcionales comúnmente disponibles en proteínas y las funcionalizaciones requeridas en las superficies…….. 6

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3. Volumen empleado en cada ciclo de ultrafiltración…….. 19
Tabla 4. Volumen empleado en cada lavado de la ultrafiltración……. 20

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5. Concentración de la BSA* y cantidad de Alexa Fluor® 647 presente en cada fracción medido con Nanodrop…… 24
Tabla 6. Resultados de la reducción con 2-MEA (BSA)……. 27
Tabla 7. Resultados de la digestión con papaína (BSA)…… 28
Tabla 8. Resultados de la digestión tras la ultrafiltración (BSA)……. 28
Tabla 9. Resultados de la digestión tras la cromatografía de afinidad (BSA)…… 28
Tabla 10. Resultados de la digestión de la antiCRP…… 35

Ab	Anticuerpo
BSA	*Bovine Serum Albumin* (Albúmina de suero bovino)
BSA*	Albúmina de suero bovino marcada con *Alexa Fluor® 647*
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
C_H	Región constante de la cadena pesada
C_L	Región constante de la cadena ligera
CRP	*C-Reactive Protein* (Proteína C reactiva)
CRP*	Proteína C reactiva marcada con *Alexa Fluor® 647*
DMSO	Dimeltil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPI	Interferometría de Polarización Dual
E. coli	*Escherichia coli*
EMBL	*European Molecular Biology Laboratory*
Fab	Fragmento de unión al antígeno
Fc	Fracción constante o cristalizable
Fv	Fragmento variable
hIgG	*Half-IgG*
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
LDS	Dodecilsulfato de litio
MALDI-TOF	*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NHS	N-hidroxisuccinimida
PCR	*Polimerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDB	*Protein Data Bank*
PEG	Polietilenglicol
POC	*Point-of-care*
QCM	Microbalanza de Cristal de Cuarzo
QD	*Quantum Dots*
SDS-PAGE	*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SOI	*Silicon on insulator*
SPR	Resonancia de Plasmón Superficial
V_L	Región variable de la cadena ligera
V_H	Región variable de la cadena pesada
α-BSA	Anticuerpo anti-BSA
α-CRP	Anticuerpo anti-CRP
2-MEA	Mercaptoetilamina

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN A LA TECNOLOGÍA DE LOS *MICROARRAYS.*

Desde hace unos años, los biochips de proteínas han emergido como una herramienta prometedora en el campo de la proteómica y del diagnóstico para obtener información acerca de funciones e interacciones proteicas. Se han llevado a cabo innovaciones tecnológicas importantes, sin embargo sigue siendo preciso un mayor desarrollo, especialmente en la inmovilización de proteínas, con el objetivo de maximizar el potencial de estos biochips. Así pues, un paso clave en estas tecnologías es la inmovilización de proteínas, que necesitan ser dispuestas en la superficie ordenadamente y en una alta densidad para permitir el empleo de la menor cantidad de muestra posible. Además, se debe evitar la adsorción proteica inespecífica o, al menos, minimizarla para mejorar la detección. En definitiva, uno de los retos actuales de los biochips es conseguir la máxima retención de proteínas conservando su conformación y su actividad (Rusimi et al., 2007).

2. DEFINICIÓN DE *MICROARRAY*. TIPOS.

Un biochip, también conocido como *microarray*, se define como una colección de *spots* (puntos) miniaturizados ordenados en un sustrato sólido que permite llevar a cabo varios análisis de manera simultánea consiguiendo barridos de alto rendimiento (Zhu et al., 2001). Los biochips de DNA fueron los primeros en ser desarrollados para monitorizar simultáneamente los niveles de expresión de varios genes. Sin embargo, los niveles de expresión de mRNA y la correspondiente abundancia proteica no siempre se corresponden debido a las modificaciones post-traduccionales (LaBaer et al., 2001). Los *microarrays* basados en proteínas (Figura 1) ofrecen la posibilidad de analizar simultáneamente cientos de macromoléculas para una determinada propiedad, permitiendo el paso de la genómica a la proteómica. Por ejemplo, la actividad enzimática puede ser determinada mediante un *screening* de la función de cientos de muestras de proteínas en paralelo empleando un *microarray*. Además de su uso en proteómica, hay una gran variedad de aplicaciones, como el desarrollo de fármacos y las pruebas diagnósticas. En particular, los biochips de proteínas tienen un gran potencial en el diagnóstico clínico mediante la comparación de los perfiles de expresión de muestras sanas y de pacientes, ofreciendo una herramienta fiable, rápida, cuantitativa, y de identificación simultánea de varios biomarcadores. Finalmente, los *arrays* de antígenos representan un potente abordaje para la caracterización de anticuerpos y para perfilar los diagnósticos y pronósticos.

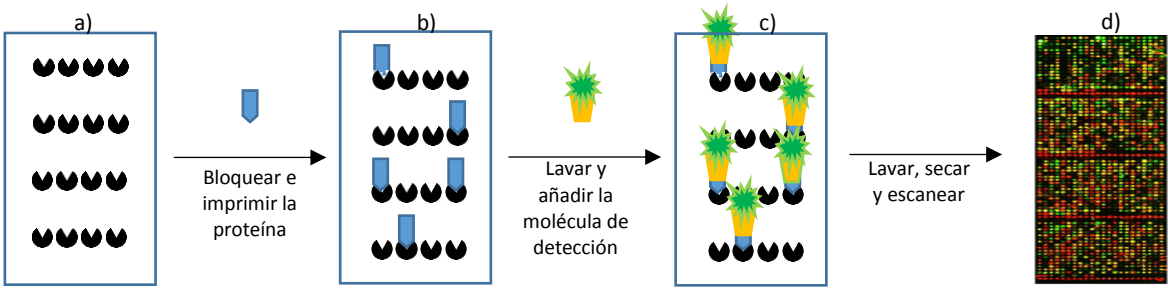

Figura 1. Esquema de preparación y uso de un *microarray* de proteínas. a) Derivatización de la superficie. b) Impresión de la proteína o bioreceptor que interacciona con la superficie derivatizada. c) Lavado para eliminar los bioreceptores que no se han anclado a la superficie y adición del analito marcado. d) Detección y cuantificación de la cantidad de analito marcado que se ha unido al bioreceptor (chip comercial).

Un biochip de proteínas ideal debe estar constituido de un material apropiado, modificado con grupos activos que reaccionen específicamente con un grupo funcional presente en la proteína a inmovilizar. Las proteínas deben estar orientadas en la superficie de manera que los sitios de unión estén expuestos a la muestra.

Determinar la superficie óptima para cada aplicación es crucial y tiene mucha influencia en la fiabilidad del experimento. Hasta la fecha se han desarrollado una gran variedad de microdispositivos, la mayoría basados en los sustratos más comúnmente empleados en los *arrays* de DNA, pero el diseño de biochips de proteínas tiene algunos problemas adicionales debido a la alta sensibilidad que tienen las proteínas para cambiar su conformación en función del medio que las envuelve. En general, las superficies de vidrio derivatizadas con organosilanos son las superficies más habituales. Dado que un *microarray* consiste en un gran número de moléculas en un área superficial muy pequeña (< 250 µm), la densidad de los grupos activos en la superficie es un factor clave que permite la reducción de la cantidad de muestra a emplear y tienen una gran influencia en la sensibilidad final del *array* (Rusmini et al., 2007).

Hay ciertos aspectos que hay que tener en cuenta en la fabricación de un *microarray*, y que son realmente importantes, ya que el éxito de esta tecnología reside en una correcta elección de los aspectos que se mencionan a continuación.

3. ASPECTOS A TENER EN CUENTA EN LA FABRICACION DE UN *MICROARRAY.*

3.1 Elección de soportes. Tipos de superficie.

Como se ha comentado anteriormente, el éxito de un *microarray* reside en conseguir inmovilizar receptores con una alta capacidad de unión al analito y, a la vez, con una baja unión inespecífica. Para ello, la elección del tipo de superficie es muy importante.

Históricamente, en el desarrollo de *microarrays* de proteínas, y con el objetivo de conseguir una mayor densidad de puntos en primer lugar surgieron los *arrays* basados en la impresión (*spotting*) de bacterias en filtros de nitrocelulosa (de Wildt et al., 2000).

Continuando con la necesidad de miniaturizar cada vez más los *arrays* pero conservando la composición y la estructura de las proteínas, su funcionalidad y su capacidad de unión, surgieron las superficies de vidrio bidimensionales (2D). La estructura rígida de las superficies del vidrio permite un incremento de la densidad de puntos a la vez que ensayos cuantitativos con una menor cantidad de muestra (Haab, B.B. et al. 2001).

Así, los primeros intentos en un plano se realizaron en superficies de vidrio (Figura 2a), modificadas químicamente de diferentes maneras incluyendo grupos aldehído, epoxi o ácidos carboxílicos (Sobek y Schlappbach, 2004). Estas superficies unen proteínas y anticuerpos ya sea por interacciones electroestáticas o mediante la formación de enlaces covalentes. A pesar de que ofrecen numerosas ventajas como un enlace fuerte, sufren una rápida evaporación del líquido en el cual se encuentran y también disminuyen el área de contacto de la proteína con la superficie, con lo que la estructura tridimensional de las proteínas se puede ver afectada. Una alternativa son los geles tridimensionales (3D) o las superficies recubiertas por membranas (Figura 2b) como poliacrilamida, agarosa y nitrocelulosa. Estas superficies unen proteínas principalmente por adsorción física y son las más favorables para preservar la conformación nativa de las proteínas, sin embargo las grandes variaciones en la intensidad de señal son una desventaja de estas superficies. El tercer grupo incluiría superficies recubiertas con dendrímeros o capas de avidina (Figura 2c-e) las cuales mezclan los conceptos mencionados anteriormente. No tienen estructura 3D visible pero no pueden ser consideradas bidimensionales porque se dispone de una estructura supramacromolecular en su superficie.

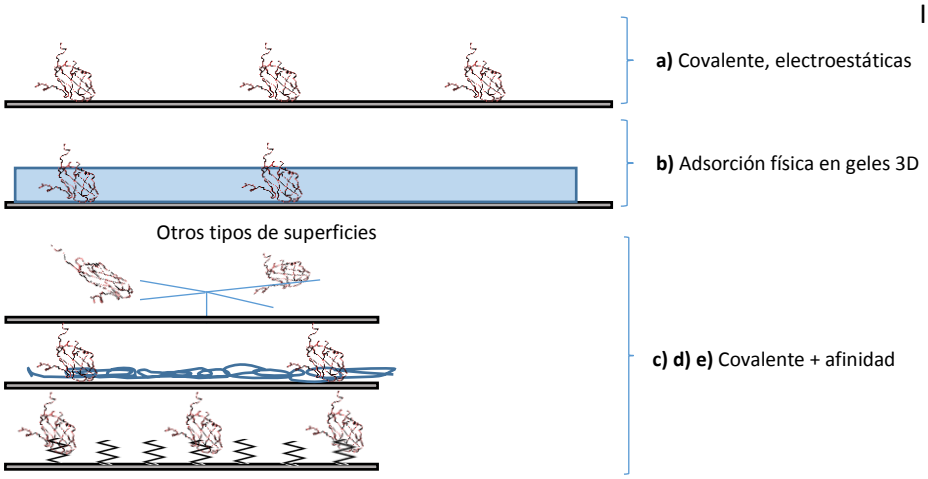

Figura 2. Conceptos de los mecanismos de unión a las superficies en *microarrays* de proteínas y anticuerpos. La imagen muestra tres clases de superficies y los principales métodos de unión. a) Superficies de vidrio modificadas químicamente. b) geles tridimensionales o superficies recubiertas por membranas. c), d) y e) Superficies recubiertas con dendrímeros o capas de avidina.

3.2 Elección de la sonda.

El siguiente paso en la construcción de un *microarray* es la elección del tipo de sonda. Dependiendo de si se trabaja con *microarrays* de DNA o proteína la manera de elegir la sonda varía de manera significativa.

Los *microarrays* de DNA se clasifican principalmente en cDNA o en *microarrays* de oligonucleótidos. Los *microarrays* de cDNA se construyen a partir de DNA de doble cadena generada en la mayoría de los casos por PCR (*Polimerase Chain Reaction*), mientras que en los *microarrays* de oligonucleótidos se emplean estos directamente (Chou et al., 2004). Existen bases de datos tales como UniGene, GenBank o EMBL en las cuales se pueden obtener mucha información acerca de determinados genes e incluso secuencias homólogas en distintas especies.

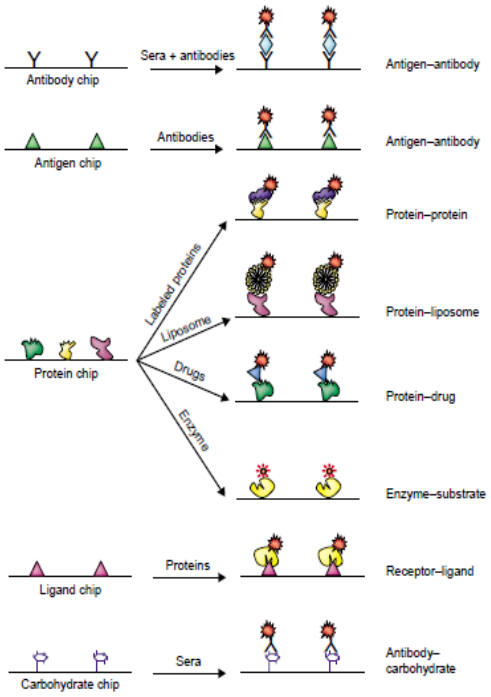

Figura 3. Tipos de *microarrays* de proteínas (Zhu y Snyder, 2003).

De distinta manera, la elección de la sonda en el caso de *microarrays* de proteínas es más complicado y no basta con buscar únicamente en una base de datos como puede ser *Protein Data Bank* (PDB), ya que no todos los genes se expresan y además en el caso de eucariotas pueden estar sometidos a modificaciones post-traducciones (Figura 3). Además, es necesario separar las proteínas y purificarlas. Otra dificultad que encontramos en el caso de las proteínas es que no tienen un patrón definido como el DNA y es que las proteínas tienen una gran diversidad en lo que a su estructura y composición se refiere, además no existen técnicas de amplificación como la PCR; por todo ello, hay que ser especialmente cuidadoso a la hora de elegir las proteínas a emplear en el *microarray*. Todo esto ha hecho que el desarrollo de los *microarrays* de proteínas haya tenido una evolución más lenta.

3.3 Formas de marcaje.

Tras la elección del tipo de superficie y el tipo de sonda a emplear es de vital importancia elegir de manera adecuada el marcador ya que gran parte de la sensibilidad del *microarray* reside en la correcta elección de éste.

La detección se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes: bien detección directa, mediante el uso de moléculas de reconocimiento marcadas o mediante técnicas sin marcaje o *label-free*, bien detección indirecta, sin ninguna modificación de la molécula analito sino empleando un trazador.

Dentro del marcaje directo, tanto el marcaje con radiactividad, usando isótopos como el I^{125} o el H^{3}, como el marcaje fluorescente, usando Cyanina o Alexa, son de los más empleados. El marcaje radioactivo es el más sensible pero ha sido reemplazado poco a poco por otros métodos, debido a la contaminación radioactiva, los problemas asociados con el tratamiento de los residuos y sobre todo, la incompatibilidad con las tecnologías de *screening* de alto rendimiento.

Por el contrario, los marcadores fluorescentes son cada vez más usados y hoy en día es el método de marcaje más empleado en *microarrays*. Además, el desarrollo de marcadores con altos rendimientos cuánticos y estables frente al pH, con una franja de emisión y de excitación estrecha, promueven su aplicación para la detección múltiple con distintos colores en *microarrays*. El empleo de este tipo de detección multicolor ofrece varios beneficios ya que las medidas de los *microarrays* no se pueden cuantificar de manera absoluta pero sí relativa, la detección simultánea permite la comparación directa de diferentes muestras sin variación entre los chips (Angenendt P, 2005). Entre los marcadores fluorescentes más prometedores se encuentran los *quantum dots* (QD) semiconductores que son más brillantes y más estables que los marcadores orgánicos.

Los marcajes indirectos generalmente implican un trazador genérico como, por ejemplo anticuerpos secundarios específicos marcados para la detección de un anticuerpo primario o proteínas marcadas para el reconocimiento de anticuerpos recombinantes. Aunque el riesgo de sufrir inespecífica por el empleo de *binders* genéricos es una desventaja, la detección indirecta no tiene el riesgo de cambiar las propiedades del analito como pueden hacerlo los métodos directos (Tabla 1).

Tabla 1. Técnicas de marcaje (Angenendt P., 2005). NHS: N- N-hidroxisuccinimida. RCA: Amplificación en círculo rodante. TSA: *tyramide signal amplification.*

	Agentes empelados	Método	Ventajas	Desventajas
Marcaje directo	Fluoróforo-NHS éster	Unión directa del marcador al analito	No se requieren pasos adicionales de incubación	El marcaje reproducible de soluciones proteicas complejas es difícil El marcaje puede alterar la estructura de la proteína Es necesario eliminar el marcador sin unir
Marcaje indirecto	Conjugados fluoróforo-anticuerpo secundario Conjugados molécula específica-anticuerpo Conjugados fluoróforo-estreptavidina TSA: conjugado peroxidasa de rábano-anticuerpo secundario, conjugado fluoróforo-tiramida	La incubación con trazadores genéricos marcados es a menudo específica de especie TSA: la formación enzimática de radicales tiramida que se unen al grupo fenol de los residuos de tiroxina.	Los trazadores genéricos marcados se puede obtener comercialmente No es necesario un paso de marcaje Las fusiones enzima-anticuerpo están disponibles comercialmente	Requiere un paso adicional de incubación Todos los analitos necesitan un motivo o una etiqueta al cual el trazador genérico puede unirse Se requieren pasos de lavado exhaustivo
Marcaje enzimático	RCA: Conjugado anticuerpo-cebador, DNA circular, polimerasa, sondas de oligonucleótidos fluorescentes	RCA: extensión del primer e hibridación de las sondas de oligonucleótidos marcadas	Las enzimas se puede unir directa o indirectamente al analito	Se pueden dar grandes variaciones en función de los tiempos de incubación

Por el contrario, las técnicas *label-free* son las técnicas que no emplean marcaje para la monitorización siendo capaces de simplificar los bioensayos porque eliminan la necesidad de marcar los reactivos. Estos métodos dependen de la medida de propiedades inherentes a la molécula a analizar, como la masa o las propiedades dieléctricas. Las técnicas *label-free* impiden las interferencia que pueden causar las moléculas marcadas y determinan la cinética de las interacciones biomoleculares a tiempo real (Chamritski et al., 2007).

Entre las técnicas más importantes podemos encontrar la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR), los nanosensores de óptica integrada, la Interferometría de Polarización Dual (DPI), la Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM) o la espectrometría de masas (MALDI-TOF).

3.4 Métodos de inmovilización.

Una vez elegida la sonda, la superficie y el método de marcaje, el siguiente paso a considerar es la inmovilización de la sonda a la superficie. La inmovilización puede ser definida como la unión de las moléculas a una superficie resultando en la pérdida de movilidad. La manera en la que las proteínas son inmovilizadas determinará las propiedades del *array*. En muchos casos, la inmovilización conduce a una pérdida parcial o total de la actividad proteica debida a una orientación aleatoria o a una modificación conformacional. Para conseguir mantener la actividad biológica, las proteínas se deben unir a las superficies sin sufrir cambios que afecten a su conformación o función, se dice entonces que se han inmovilizado de manera "biodisponible". Generalmente la elección de la técnica de inmovilización está determinada por las propiedades químicas y fisicoquímicas de las superficies y de las proteínas. Los métodos de inmovilización se pueden dividir en tres categorías: físicos, químicos y de bioafinidad.

3.4.1 ***Inmovilización física***: Las proteínas se pueden adsorber a las superficies mediante fuerzas intermoleculares, principalmente por enlaces iónicos y por interacciones polares e hidrofóbicas. Qué fuerzas intermoleculares actúan en la interacción depende de la proteína y de la superficie involucrada. La capa resultante tenderá a ser heterogénea y orientada

aleatoriamente, ya que cada molécula puede interactuar con la superficie con diferentes orientaciones para minimizar las repulsiones con el sustrato adsorbido. La capacidad de adsorción está limitada por la geometría de las proteínas inmovilizadas. Una alta densidad de bioreceptores podrían conducir al bloqueo estérico de los sitios activos de las proteínas interfiriendo con sus propiedades funcionales. (Rusmini et al., 2007). Aun así, es uno de los métodos más empleados para la inmovilización de las proteínas debido a su simplicidad.

3.4.2 ***Inmovilización covalente***: Con mucha frecuencia, las proteínas son unidas covalentemente a la superficie a través de aminoácidos que tienen grupos funcionales accesibles. Los enlaces covalentes se forman la mayoría de veces entre grupos funcionales de cadenas laterales de proteínas con superficies correctamente modificadas, esto resulta en una unión irreversible dando lugar a una gran superficie de unión (Tabla 2).

Tabla 2. Grupos funcionales comúnmente disponibles en proteínas y las funcionalizaciones requeridas en las superficies.

Cadenas laterales	Aminoácidos	Superficies
$-NH_2$	Lys, Hidroxil-Lys	Ácidos carboxílicos
		Ésteres activos (NHS)
		Epóxidos
		Aldehídos
-SH	Cys	Maleimidas
		Piridil disulfuros
		Vinil sulfonas
-COOH	Asp, Glu	Aminas
-OH	Ser, Thr	Epóxidos

Las uniones químicas a través de las cadenas laterales de los aminoácidos pueden ser aleatorias, ya que se basan en los aminoácidos que están típicamente presentes en el exterior de las proteínas, por lo que la unión puede producirse simultáneamente a través de varios residuos, aumentando la heterogeneidad de las proteínas inmovilizadas (inmovilización inespecífica). Las uniones químicas también se pueden realizar de manera ordenada para conseguir una inmovilización orientada (inmovilización específica). Un procedimiento que garantice una inmovilización bien definida dará lugar a una inmovilización reproducible y orientada, impidiendo la desnaturalización debida a la reacción de aminoácidos con grupos que no están implicados en la unión. La inmovilización específica requiere la funcionalización de las moléculas a inmovilizar y de la superficie (Rusmini et al., 2007).

3.*4.2.*1 Inmovilización inespecífica: En principio, todos los grupos funcionales de los aminoácidos recogidos en la Tabla 2 pueden ser usados para la unión con las superficies derivatizadas mediante técnicas de bioconjugación.

3.*4.2.1.1 Química de las aminas*: Los residuos de lisina son los más empleados como puntos de unión ya que se encuentran presentes normalmente en el exterior de las proteínas. Desafortunadamente, su abundancia puede generar un punto de unión múltiple a la superficie, incrementando la heterogeneidad y la restricción de la flexibilidad conformacional. Los grupos N-hidroxisuccinimida (NHS) son comúnmente empleados para unir grupos aminos con los cuales forman amidas estables. Las proteínas necesitan ser disueltas en un tampón de baja fuerza iónica y ser transferidas a una superficie activada. Los ésteres de NHS entonces reaccionan con los grupos nucleofílicos de las proteínas, creando una unión amida fuerte. La eficiencia de la inmovilización depende de varios factores como pueden ser el pH, la concentración, la

fuerza iónica, y el tiempo de reacción, pero todos estos parámetros deben optimizarse para cada tipo de proteína.

3.*4.2.1.2 Química del tiol*: Las cisteínas contienen un único grupo, el grupo tiol (SH), el cual es capaz de crear puentes disulfuro internos que contribuyen a la estabilidad de las proteínas. Dado que las cisteínas no son tan abundantes como las lisinas, la inmovilización aleatoria es más difícil que ocurra. Los puentes disulfuro participan en las reacciones de intercambio con otros tioles conduciendo a la formación de nuevos puentes disulfuro. La reversibilidad de la unión por la exposición a agentes reductores puede llegar a ser un problema para conseguir una inmovilización estable.
Las vinil sulfonas reaccionan con los grupos –SH mediante una reacción conjugada, también conocida como reacción de Michael (Figura 4). Se ha observado que se puede llevar a cabo una modificación selectiva de los grupos cisteína de las proteínas bajo condiciones suaves y fisiológicas (Masri et al., 1988). Las reacciones con grupos tiol son efectivas en un rango de pH entre 7 y 9,5, mientras que la reacción con las aminas ocurre generalmente a pH cercanos a 9 pero con una menor velocidad.

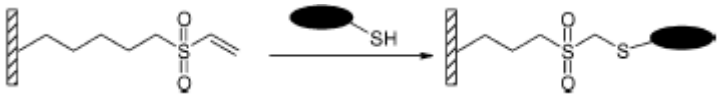

Figura 4. Superficies funcionalizadas con vinil sulfonas (Rusmini et al., 2007)

La especificidad del tiol y el hecho de que sea estable en agua son las principales ventajas de este agente que ha sido usado en la introducción de unidades de etilenglicoles en proteínas usando vinil sufonas y derivados del polietilenglicol (PEG). (Rizzi et al., 2005)

3.*4.2.1.3 Fotoinmovilización*: La fotoinmovilización usa radicales generados mediante la irradiación con una longitud de onda adecuada en presencia de un reactivo mediador fotosensible. Las reacciones radicalarias se pueden dar en todo material orgánico, incluyendo biomoléculas, matrices poliméricas y las superficies de los chips, además, no es necesario ningún grupo funcional amino, hidroxilo o tiol como otros métodos de inmovilización convencionales; incluso diferentes biocomponentes pueden ser inmovilizados por el mismo método. A diferencia de los métodos convencionales de inmovilización no hay ninguna orientación en particular cuando se usa este tipo de fotoinmovilización.

Como las proteínas fotoinmovilizadas mantienen su actividad biológica, incluso después de la inmovilización, se puede considerar que la fotoirradiación no supone una destrucción significativa de la estructura 3D de las biomoléculas inmovilizadas, y por tanto, se puede aplicar esta tecnología para la fabricación de *microarrays* de proteínas (Yoshihiro Ito, 2006). Es una reacción que se lleva a cabo en un solo paso, la cual es rápida y eficiente y no requiere la funcionalización de las moléculas diana. Como se ha mencionado anteriormente, la biocompatibilidad es quizás la mayor ventaja ya que se emplean mediadores fotosensibles como las benzofenonas y las diazirinas que son activadas por irradiación a longitudes de onda superiores o iguales a 350 nm que son transparentes para la mayoría de las biomoléculas (Rusmini et al., 2007).

3.4.2.2 Inmovilización de sitio específico: Para conseguir que todas las biomoléculas estén orientadas dejando todos los sitios de unión expuestos a la muestra, se necesita conseguir una unión uniforme a la superficie. Se han desarrollado diferentes técnicas, la mayoría de las

cuales necesitan la funcionalización de las superficies y la modificación del bioreceptor a inmovilizar.

3.4.2.2.1 Cicloadición de Diels-Alder: Normalmente tiene lugar entre dienófilos sustituidos con grupos electrón-atrayentes y un dieno conjugado para formar un anillo insaturado de seis miembros.

3.4.2.2.2 Química "click": La cicloadición 1,3-dipolar de una azida y un alquino para formar 1,2,3-triazoles ha sido llamada reacción *"click"* ya que únicamente necesita unos simples pasos de preparación y purificación, generando rápidamente nuevos productos (Kolb et al., 2001).

3.4.2.2.3 Ligación de α-oxo semicarbazonas: La preparación de semicarbadizas es llevada a cabo ya sea mediante la silanización y reacción con Fmoc-$NHNH_2$, o a través de la silanización directa en la superficie de vidrio con un silano semicarbadizo. La reacción entre la semicarbadiza y un grupo aldehído conduce a la formación de enlaces semicarbazonas estables (Rusmini et al., 2007)

3.4.3 ***Inmovilización por bioafinidad***: Las reacciones de afinidad bioquímica dan lugar a una gran cantidad de proteínas inmovilizadas de manera orientada, lo que supone una gran ventaja con respecto a otras técnicas de inmovilización. Sin embargo, no solo se obtiene una unión homogénea y orientada, sino que también es posible desanclar proteínas y reutilizar la misma superficie. Ejemplos de este tipo de unión serian el sistema biotina-avidina o el sistema *His-Tag*.

Además de todo lo anterior, un aspecto también muy importante en la etapa de inmovilización de la sonda es la manera en la que está se deposita en el *microarray*. Existen dos modalidades diferentes: síntesis *in situ* o *spotting*. La síntesis *in situ* solo se puede realizar en sondas de DNA mientras que el *spotting* se puede utilizar tanto para la construcción de *microarrays* de DNA como de proteínas. Dado que en el presente trabajo se emplean *microarrays* de proteínas nos vamos a centrar exclusivamente en el *spotting*.

La técnica del *spotting* se basa en la deposición de una disolución que contiene las proteínas sobre la superficie del *array* empleando un robot. Esta deposición puede realizarse por contacto o sin contacto (*ink-jet*) (Figura 5). Asimismo, la deposición en la impresión *ink-jet* se puede realizar con jeringas solenoides, inyectores piezoeléctricos o inyectores térmicos.

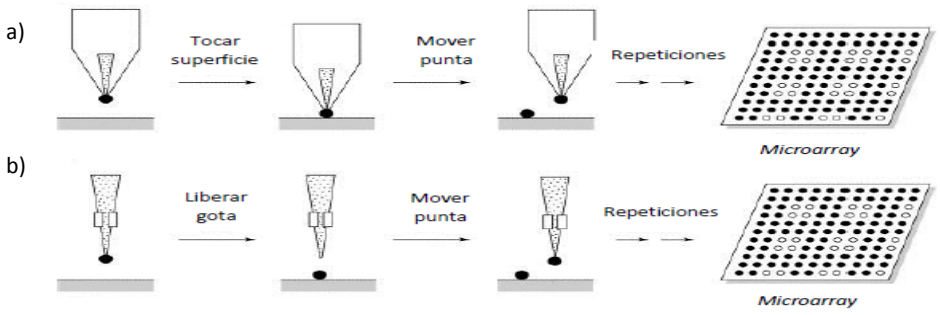

Figura 5. Diferentes modalidades de fabricación de un *microarray*: a) *spottin*g por contacto b) *spotting* sin contacto (Schena et al., 1998).

4. LECTURA DEL *MICROARRAY.* DETECCIÓN.

La técnica de detección a emplear depende del tipo de marcaje que se elija para la construcción del *microarray*. En nuestro caso, el marcaje escogido es fluorimétrico, ya que empleamos Alexa Fluor® 647 el cual es un análogo de Cy5. Dado que empleamos este tipo de marcaje, podemos encontrar una gran cantidad de instrumentos para realizar la lectura del ensayo y obtener imágenes bidimensionales como, por ejemplo, los basados en cámara CCD (Figura 6) o los escáneres de fluorescencia comerciales, como los de la serie GenePix® de la casa comercial *Molecular Devices*. Si el marcaje es colorimétrico, se pueden emplear para la medida escáneres de documentos convencionales siempre que la naturaleza del soporte lo permita.

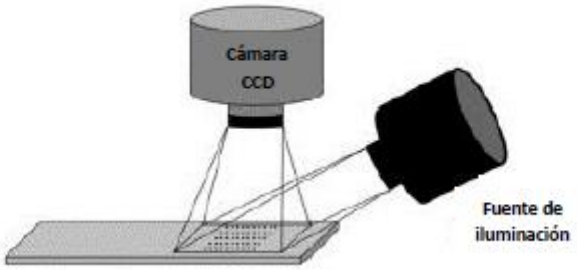

Figura 6. Esquema de un sistema de detección similar al empleado en nuestro trabajo. Consta de una cámara CCD que captura la imagen y de una fuente de iluminación, generalmente LEDs, que enfoca a la zona a capturar.

Tras la lectura del *microarray*, se obtiene una imagen 2D que contiene una serie de *spots* cuya intensidad está directamente relacionada con la cantidad de moléculas diana reconocidas por el agente de captura inmovilizado en la superficie del mismo. Esta imagen obtenida, es luego analizada con software de tratamientos de imagen, realizando un análisis de los datos con el cual se obtiene una matriz de datos correspondientes a los distintos puntos del *microarrays*, la cual nos permitirá extraer conclusiones.

5. USO DE LAS REACCIONES FOTOINDUCIDAS PARA INMOVILIZAR PROTEINAS.

De todos los métodos de inmovilización comentados con anterioridad, a nuestro parecer el de mayor potencial es el que emplea luz para promover la unión proteína-superficie. El método de fotoinmovilización hace posible una fácil inmovilización covalente de varios tipos de moléculas orgánicas y células en un chip. Además, mediante el uso de polímeros hidrofílicos como matrices, es posible reducir las interacciones no-específicas con los compuestos biológicos. Esta técnica ha sido ya probada con varias proteínas, anticuerpos y células pero su uso aún continúa en investigación. Tal y como se ha mencionado anteriormente, la fotoinmovilización requiere la presencia de agentes mediadores fotosensibles generalmente activados por irradiación con luz a una determinada longitud de onda. Tras la activación con esta luz, los agentes sufren distintos procesos que finalmente los conducen a la formación de enlaces covalentes entre los intermediarios fotogenerados y las biomoléculas (Yoshihiro Ito, 2006). Los principales grupos que se han empleado tradicionalmente para llevar a cabo la fotoinmovilización son los que se muestran en la Figura 7.

Figura 7. Principales grupos empleados en la fotoinmovilización

Así, esta técnica ha sido empleada para inmovilizar factores de crecimiento en una matriz sólida para mostrar el efecto de la proteína inmovilizada en la función celular (Chen et al., 1997). Por ejemplo, el equipo de Matsuda (Matsuda et al., 1995) usó azidofenil, benzofenona y ditiocarbamato como grupos reactivos sensibles al UV, y fluoresceína, eosina y Rosa de Bengala como compuestos fotosensibles; además emplearon uniones fotogeneradas y métodos de fotopolimerización para la inmovilización de las células diana (Matsuda et al., 1995)(Mizutani et al., 2002).

Sin embargo, todavía queda margen de mejora. Hasta el momento los métodos que utilizan fotoactivación o bien no son selectivos a un grupo funcional (se generan radicales que reaccionan de manera "inespecífica"), o bien requieren de un polímero fotoreactivo (como se ilustra en la figura 7) o bien están basados en la fotoactivación de un grupo funcional protegido que ha sido inmovilizado en la superficie mediante una reacción química, y que, tras la activación, puede reaccionar con determinado grupo funcional de la proteína.

Así, el conseguir métodos que aúnen las ventajas de la fotoactivación con la "especificidad" de estar dirigidos a un determinado grupo funcional, es altamente deseable. Una reacción que conjuga estas características es la reacción de acoplamiento tiol-eno, y su análoga usando un grupo alquino. Estas reacciones se describen a continuación así como los antecedentes en su empleo para la inmovilización de biomoléculas.

5.1 Uso de las reacciones del tiol-eno y tiol-ino para la inmovilización de proteínas.

Con el objetivo de poder explicar el papel que han tenido las reacciones del tiol-eno y del tiol-ino en la inmovilización de proteínas, primero vamos a hacer una breve introducción a las mismas.

La reacción de tiol-eno se describió por primera vez en el año 1905 (Posner, 1905), en dicho artículo Posner resaltaba la alta eficiencia de reacción entre los dobles enlaces reactivos C-C y el grupo tiol. Dentro de las reacciones del tiol, dos de las más importantes a destacar serían la reacción tiol-Michael catalizada en dobles enlaces C-C deficientes en electrones mencionada anteriormente, y la reacción del tiol-eno de adición radicalaria libre a dobles enlaces C-C pobres o ricos en electrones (Figura 8).

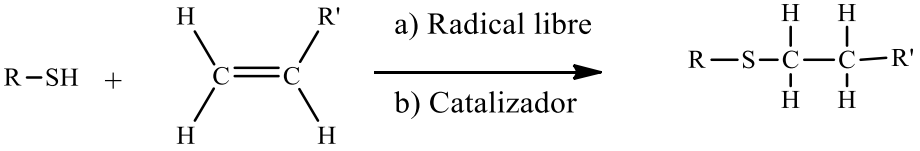

Figura 8. Reacción del tiol-eno acoplada por a) radical libre y b) reacción de adición de Michael (Hoyle y Bowman, 2010).

La reacción del tiol-eno combina eficazmente los beneficios clásicos de las reacciones *click* (procesos simples, robustos, rápidos, de rendimientos cuantitativos, concentraciones reducidas de catalizador, insensibilidad al oxígeno y al agua, ausencia de disolventes o uso de disolventes benignos, y de único producto regioselectivo) con las ventajas de procesos fotoiniciados, que pueden ser activados a tiempos y localizaciones específicas, resultando en un método poderoso para la síntesis química y la fabricaciones de materiales (Hoyle y Bowman, 2010).

Por su parte, la reacción del tiol-ino se caracteriza por la reacción entre un grupo tiol y un alquino en una relación 2:1. En esta reacción el alquino tiene la capacidad reaccionar con dos grupos tiol (Park et al., 2010), tal y como puede observarse en la Figura 9. (Lowe et al., 2010)

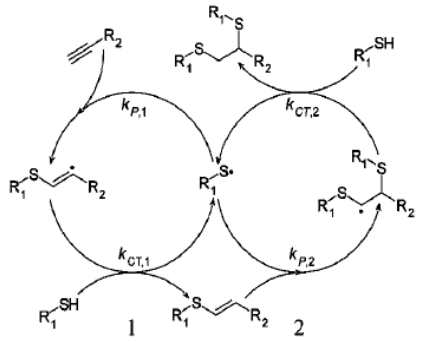

Figura 9. Reacción del tiol-ino (Lowe et al., 2010)

La reacción del tiol-ino es simple, rápida y sucede en condiciones ambientales. Como desventaja frente a la reacción del tiol-eno encontramos que ésta, aunque es bastante rápida, es más lenta que la reacción del tiol-eno y, a diferencia de ésta última, la reacción del tiol-ino es irreversible completamente (Fairbanks et al., 2009)

Los trabajos más relevantes empleando la reacción del tiol-eno para la inmovilización de proteínas en formato *microarray* son los trabajos de Waldman y colaboradores (Jonkheijm et al. 2008, Weinrich et al., 2010) que emplean superficies funcionalizadas con grupos tiol para inmovilizar biomoléculas (biotina, proteínas, etc) a las que se les ha incorporado una olefina. Los radicales tiol son generados por irradiación con un láser, obteniendo muy buena resolución espacial en la fotoinmovilización.

Por otro lado, en nuestro grupo de investigación se ha descrito la fabricación de *microarrays* de ácidos nucleicos mediante la inmovilización de sondas tioladas o alqueniladas directamente sobre superficies en base silicio mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno o tiol-ino inducidas por luz con muy buenos rendimientos de inmovilización de sonda e hibridación de cadenas complementarias (Escorihuela et al. 2012)(Escorihuela et al. 2014)(Escorihuela et al. 2014).

A pesar de todos los avances que se están realizando en este campo todavía no hay nada descrito acerca de la inmovilización de anticuerpos (sin modificar) a plataformas en formato *microarray* empleando la reacción del tiol-eno o del tiol-ino. Esto es debido a que la reacción necesita de la presencia de tioles libres y estos no se encuentran como tales en los anticuerpos, sino que están formando puentes disulfuro, muchos de los cuales son determinantes en el mantenimiento de la estructura de la proteína. En el presente trabajo nos planteamos poner a punto la metodología de inmovilización de anticuerpos utilizando la reacción del tiol-eno. Para ello planteamos varias aproximaciones que permitiesen disponer: a) bien de tioles libres o b) bien de puentes disulfuro fácilmente accesibles, y por tanto, rompibles. Estas aproximaciones se basaron en fragmentar los anticuerpos siguiendo diferentes rutas, y estudiando su capacidad para inmovilizarse de manera biodisponible sobre una superficie modificada con grupos alqueno.

6. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS.

Los anticuerpos son una poderosa herramienta para la detección proteica y molecular, aunque los anticuerpos enteros (normalmente IgG o IgM) son los elegidos a la hora de realizar la mayoría

de inmunoensayos, el desarrollo de distintas técnicas han permitido también el uso de fragmentos de anticuerpos, como pueden ser Fab o los $F(ab')_2$. Los fragmentos de anticuerpos despiertan un gran interés dado que son más pequeños y se pueden obtener mediante procesos de alto rendimiento, lo que abarataría el coste final del proceso.

Es posible cortar de manera selectiva la inmunoglobulina en fragmentos que tienen características propias. Esta fragmentación se lleva a cabo empleando agentes reductores y proteasas que digieren o cortan ciertas porciones de la estructura proteica de las inmunoglobulinas. Aunque es posible la fragmentación de todos los tipos de inmunoglobulinas, solo los procesos de fragmentación de IgG e IgM de ratón, conejo y humano están bien caracterizados a día de hoy (Figura 10).

Fruto de la digestión enzimática de los anticuerpos se obtienen dos grupos de fragmentos: el Fab que es el fragmento de unión al antígeno, y el Fc que no se une al antígeno. Existen varios tipos de Fab, pero cada uno de ellos, contiene las regiones variables de la cadena pesada y ligera (V_H y V_L, respectivamente) unidas generalmente mediante puentes disulfuro de tal forma que se conserva el sitio de unión al antígeno. Los fragmentos Fc consisten en la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulinas y media las funciones celulares efectoras.

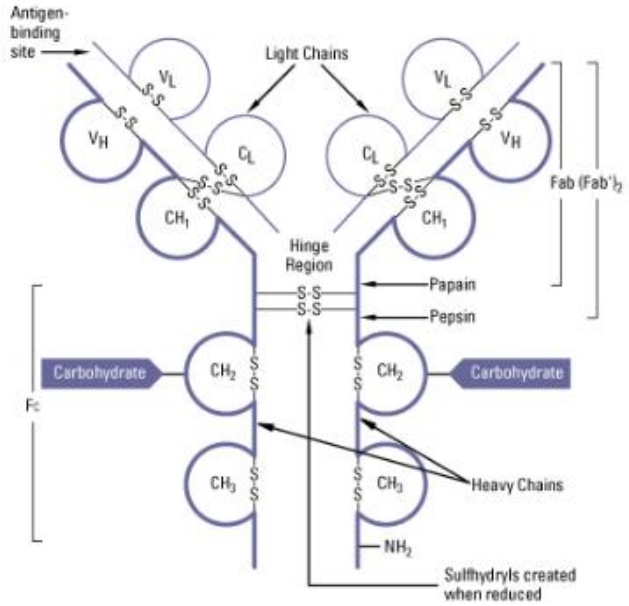

Figura 10. Estructura de un anticuerpo (IgG) y sitios de corte para su fragmentación.

La fragmentación de los anticuerpos es un proceso laborioso, requiere la optimización de la digestión enzimática y normalmente, se necesita una gran cantidad de anticuerpo para que sea eficaz.

Dado que los fragmentos presentan un menor tamaño que la molécula entera, éstos poseen una serie de ventajas que no ofrecen los anticuerpos intactos para su uso en determinadas técnicas inmunoquímicas y ciertas aplicaciones experimentales:

- ✓ Reducen la interacción inespecífica que se puede dar por la unión de la Fc.
- ✓ Permiten la eliminación de los fragmentos Fc.
- ✓ Tienen sistemas de producción más simples. La producción de fragmentos de Ab se puede realizar en sistemas microbianos como *E. coli* y levaduras.
- ✓ En el caso de utilizar sistemas de detección basados en la interacción con campo evanescente, el hecho de disponer el sitio de reconocimiento -donde ocurrirá la biointeracción con el analito- más cerca de la superficie, aumenta su efecto sobre el campo óptico de sensado (campo evanescente), aumentando, por tanto la sensibilidad del dispositivo.

$F(ab')_2$, Fab, Fab' y Fv (Figura 11) son fragmentos de unión al antígeno que puede ser generados a partir de la región variable de IgG e IgM. Estos fragmentos de unión al antígeno varían en tamaño, valencia y contenido en Fc. Los fragmentos Fc, por el contrario, se generan

exclusivamente a partir de la región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Nos centraremos en los fragmentos que son objeto de estudio en este trabajo.

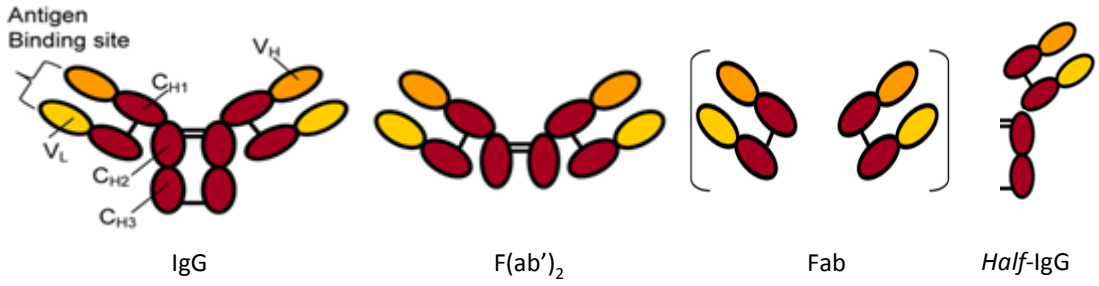

Figura 11. Tipos de fragmentos de anticuerpos

Fragmentos F(ab')$_2$: Los fragmentos F(ab')$_2$ tienen un peso molecular de 110 kDa, contienen las dos regiones de unión al antígeno y las dos cadenas están unidas por la región bisagra mediante puentes disulfuro.

Fragmentos Fab: Los Fab son fragmentos monovalentes de 50 kDa que se obtienen de IgG e IgM, constan de una VH, CH1 y VL, y regiones CL, unidas por un puente disulfuro intramolecular.

Half-IgG o "r IgG": Los *half-IgG* se refieren a las IgG reducidas y poseen un peso molecular de 75kDa. Es el producto de la reducción selectiva de los puentes disulfuro de la región bisagra. Aunque haya varios puentes disulfuro dentro de la estructura del Ab, los que se encuentran en la región bisagra son los más accesibles y los más fáciles de reducir, especialmente cuando se usan agentes reductores como la 2-mercatoetilamina (2-MEA). Los *half-IgG* son preparados frecuentemente para la exposición de los grupos sulfhidrilo de la región bisagra para realizar conjugaciones, inmovilización de Ab o marcaje enzimático.

Como se ha mencionado anteriormente estos fragmentos derivados de los Ab se pueden obtener a través de digestiones enzimáticas o agentes reductores, o bien mediante ingeniería genética a través de su expresión en bacterias o levaduras.

Usando la digestión con papaína se obtienen Fab a partir de los IgG. La papaína es una tiol-endopeptidasa no-específica, que tiene un grupo sulfhidrilo en el centro activo, el cual debe estar reducido en la forma activa del enzima. Actúa rompiendo uno o más enlaces peptídicos de la región bisagra, produciendo dos fragmentos Fab y el Fc. Aunque es menos común, también se puede usar para obtener F(ab')$_2$.

La digestión de IgGs con pepsina da lugar a fragmentos F(ab')$_2$. La pepsina es una endopeptidasa no-específica que únicamente se encuentra activa a pH ácido. Esta enzima se desnaturaliza irreversiblemente a pH neutro o alcalino. La digestión con pepsina normalmente produce fragmentos F(ab')$_2$ y numerosos péptidos pequeños procedentes de la Fc. El fragmento F(ab')$_2$ resultante está compuesto por dos puentes disulfuros que unen las dos unidades Fab.

La ficina es una proteasa tiolada que puede digerir los IgG$_1$ monoclonales de ratón tanto en Fab como en F(ab')$_2$ en función de la concentración de cisteína que se añada a la digestión. La ficina generará F(ab')$_2$ en presencia de 4 mM de cisteína y Fab en presencia de 25 mM de cisteína.

Por otro lado, a expresión en células de mamífero ha sido usada extensivamente para la producción de anticuerpos enteros correctamente glicosilados. Sin embargo, para la producción de los fragmentos de Ab, que no poseen la Fc con los glicanos unidos a su extremo N-terminal,

los sistemas de producción microbianos son los más efectivos para su producción por las siguientes razones (Arbabi-Ghahroud et al., 2005):

- ✓ Fácil generación y producción de las cadenas.
- ✓ Corto tiempo de fermentación.
- ✓ Medios de fermentación sencillos.
- ✓ Robustez y escalabilidad de la fermentación microbiana
- ✓ No requiere test para virus o pasos adicionales de reducción de virus.

Estos factores pueden reducir los costes por la reducción de los tiempos de producción. De entre los cultivos microbianos *E. coli* es un sistema de expresión apropiado y versátil con muchas características adecuadas para la producción de fragmentos de Ab (Liddell JM, 2009).

Dadas estas características, sería muy interesante comprobar si los productos obtenidos de bacterias poseen las mismas características que los fragmentos obtenidos a partir de Ab. Si se comportaran igual, siempre y cuando, no tuvieran un precio desorbitado, se podría recomendar su empleo ya que evitaría la pérdida de producto en el proceso de fragmentación del anticuerpo, así como también, resultaría en un ahorro de tiempo ya que evitaría los largos tiempos de digestión con las enzimas.

En este trabajo la fuente de obtención de los distintos fragmentos de anticuerpos ha sido la digestión enzimática y el uso de agentes reductores.

7. CONTEXTO EN EL QUE SE DESARROLLA ESTE TFG. PROYECTO PHOCNOSIS.

El trabajo realizado en este TFG se enmarca dentro de las tareas a desarrollar por el grupo de investigación para un proyecto europeo financiado por el programa Horizon2020. Dicho proyecto lleva por título "*Advanced nanophotonic point-of-care analysis device for fast and early diagnosis of cardiovascular diseases (PHOCNOSIS)*", su objetivo es el desarrollo y la prevalidación de un dispositivo biosensor de análisis *point-of-care* (POC) portátil para su aplicación en el diagnóstico precoz de enfermedades cardiovasculares. El diagnóstico se basará en la detección rápida (<10 minutos), ultra-sensible (<1 ng/L), sin utilizar marcadores (*label-free*) y simultánea de diversos biomarcadores cardiacos de relevancia haciendo uso de una pequeña muestra de sangre del paciente (<100 µL). El transductor que se emplea es una guía corrugada de óxido de silicio (sistema de óptica integrada basado en guías de ondas) y los marcadores son proteínas (troponina, CRP, etc) por lo que se realizará un inmunoensayo para la detección.

Es un proyecto multidisciplinar que combina diversas áreas de conocimiento como óptica, fotónica, electrónica, microfluídica, biología, medicina y química, a través de la colaboración de grupos expertos en cada campo.

Una de las tareas a desarrollar dentro del proyecto por nuestro grupo de investigación es la optimización de los métodos de inmovilización de fragmentos de anticuerpos sobre el material que constituirá la guía corrugada (transductor). El hecho de usar fragmentos de anticuerpos en lugar del anticuerpo completo obedece a dos motivos:

1) El emplear un fragmento dispone el sitio de reconocimiento más próximo a la superficie del sensor, aumenta su interacción con el campo óptico de sensado, e incrementando así la sensibilidad del dispositivo.
2) Los fragmentos disponen, en principio de grupos tiol libres o al menos, puentes disulfuros más accesibles para ser empleados en la reacción de anclaje a la superficie mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno.

El empleo de la reacción tiol-eno para la unión del bioreceptor a la superficie del transductor permite controlar la localización selectiva de los receptores únicamente en las áreas sensoras del transductor y no por toda la superficie. Esto se consigue mediante la irradiación selectiva en las zonas en las que se desea el anclaje. Anclar selectivamente en las áreas sensoras del dispositivo también contribuye e aumentar la sensibilidad, ya que el analito se retendrá únicamente en zonas donde puede ser medido y cuantificado, no perdiéndose diana en zonas donde la interacción no puede ser medida.

Para el proceso de optimización de los métodos de anclaje se trabaja en dos etapas. En un primer estadio se realiza la optimización de los parámetros de funcionalización superficial y condiciones de anclaje y reconocimiento trabajando en un formato *microarray* de fluorescencia, que hace más barato y rápido el proceso de optimización. A partir de los parámetros pre-optimizados usando esta metodología, se transfiere el modo de anclaje a las guías de onda corrugadas y se re-ajustan las condiciones que requieran ser afinadas.

En el primer estadio de la investigación es donde se ha realizado este TFG, optimizando las fragmentaciones de anticuerpos, las funcionalizaciones superficiales y las condiciones de inmovilización de los fragmentos de anticuerpo. Puesto que los materiales finales son en base silicio (óxido de silicio) se trabajó con portaobjetos de vidrio, que responden de manera análoga al óxido de silicio frente a la funcionalización con organosilanos y resultan una opción más económica manteniendo unas propiedades ópticas muy buenas.

OBJETIVOS

Día a día, se están desarrollando nuevas técnicas de diagnóstico clínico rápido. Esto es debido a que las enfermedades con una mayor mortalidad podrían atenuarse o, incluso, llegar a curarse si fueran diagnosticadas de manera precoz.

Más concretamente, en este TFG, que se enmarca en un proyecto europeo financiado por el programa *Horizon2020*, se plantea la puesta a punto de métodos de inmovilización de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos haciendo empleo del uso de reacciones fotoinducidas tipo tiol-eno y de técnicas de *microarray* de fluorescencia. Los desarrollos, una vez optimizados, serán aplicables a la inmovilización de bioreceptores específicos de biomarcadores cardiacos, en transductores fotónicos para la construcción de un dispositivo *point-of-*care, de detección precoz de riesgo o enfermedad cardiovascular.

Para alcanzar este objetivo final primero nos debemos centrar en los siguientes objetivos particulares:

1. Funcionalizar químicamente las superficies de vidrio para disponer de grupos alqueno reactivos y caracterizar dichas modificaciones
2. Establecer un protocolo de fotoinmovilización de anticuerpos mediante reacción de acoplamiento tiol-eno para un sistema modelo (BSA/αBSA)
   2.1. Obtener los distintos fragmentos de Ab, caracterizarlos y estudiar su fotoinmovilización empleando la tecnología de *microarray* de fluorescencia
   2.2. Caracterizar de biodisponibilidad de los anticuerpos y fragmentos inmovilizados para reconocer a su diana.
3. A partir de los resultados obtenidos con el sistema modelo, transferir los resultados a la inmovilización de receptores específicos de biomarcadores cardiovasculares, concretamente, se plantea la puesta a punto del sistema CRP (*C-reactive protein*)/αCRP.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

Los reactivos albúmina de suero bovino (BSA) (≥98%, polvo liofilizado), proteína C reactiva (CRP) de plasma humano recombinante expresada en *E.coli* (en solución 0,02 M Tris, 0,28 M cloruro de sodio, 0,005 M cloruro de calcio, pH 7,8-8,2 con 0,1% azida de sodio), viniltrimetoxisilano 97%, pepsina procedente de la mucosa gástrica de porcino y anti-BSA (α-BSA) contenida en el suero completo (contiene 15 mM de azida sódica) ,fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich (Madrid, España).

CRP Antibody (α-CRP) (C7, producida en ratón) fue adquirida en la casa comercial ThermoFisher Scientific (Rogensburg, Alemania).

El hidrocloruro de 2-mercaptoetilamina (2-MEA) fue adquirido de Thermo Scientific (Rockford, U.S.A)

La mayoría de las sales empleadas en la preparación de los diferentes tampones fueron adquiridas de Scharlau (Barcelona, España).

Los tampones empleados en los distintos ensayos, tanto para la preparación de disoluciones como para el lavado, fueron los siguientes: PBS 1×: fosfato sódico dibásico 0,8 mM, fosfato sódico monobásico 2 mM, cloruro sódico 137 mM y cloruro potásico 2,7 mM, pH 7,5; PBS-T 1× (fosfato salino-Tween): PBS 1× con Tween 20 al 0,05%; tampón carbonato (TC): carbonato sódico anhidro 15 mM, hidrógeno carbonato sódico 34 mM, pH 9,6; PBS-Básico: 2,77 mM fosfato sódico monobásico 2,77 mM, fosfato monopotásico 0,18 mM, pH = 8,2; Glicina-HCl: glicina 0,2 M, HCl 0,2M, pH = 2,5.

La HiTrap™ Protein A HP fue adquirida de GE Healthcare (Uppsala, Suecia).

Los cubreobjetos de vidrio de dimensiones 18x18 mm fueron suministrados por Deltalab (Barcelona,España).

Los portaobjetos de vidrio de dimensiones 26x76 mm y bordes esmerilados se obtuvieron de Labbox Labware (Barcelona, España).

El reactivo viniltrietoxisilano 98% fue adquirido en la casa Acros Organics (Geel, Belgium).

Los tubos Pierce® Concentrator, PES, 30K fueron adquiridos de Thermo Scientific (Escocia, Inglaterra, Reino Unido).

Los tubos Pierce® Concentrator, PES, 3K fueron adquiridos de Thermo Scientific (Escocia, Inglaterra, Reino Unido).

Los filtros Amicon ® Ultra – 2 mL Centrifugal Filters Ultracel® 50K fueron adquiridos de Merck Millipore (Cork, Irlanda).

El fluoróforo Alexa Fluor® 647 NHS ester fue proporcionado por la casa Molecular Probes de Life Technologies (Madrid, España).

Se emplearon 2 kits comerciales: Pierce™ Fab Preparation Kit y Pierce™ Mouse IgG_1 Fab and $F(ab')_2$ Micro Preparation Kit; ambos fueron adquiridos de la casa comercial Thermo Scientific (Escocia, Inglaterra, Reino Unido).

El tampón de carga Pierce™ LDS Sample Buffer Non-Reducing (4×), el tampón NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20×), los geles de electroforesis NuPAGE® Bis-Tris Precast Gels y el

antioxidante NuPAGE® Antioxidant fueron adquiridos de la casa comercial Thermo Scientific (Rockford, U.S.A).

El azul de comassie Bio-Safe™ Coomassie Stain fue adquirido de la casa comercial Bio-Rad Laboratories S.A. (Madrid, España)

2. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

Para la funcionalización de los chips se empleó un "*spin coater*" Laurell WS-650MZ-23NPPB el cual necesita una entrada de argón y un sistema de vacío. Fue adquirido de la casa comercial Laurell Technologies Corporation (North Wales, U.S.A)

Para la impresión de los *microarrays* se empleó el equipo AD1500 de Biodot Inc. (Irvine, CA, EEUU), con sistema de impresión sin contacto y aguja de material cerámico.

Para la detección de la fluorescencia se empleó un sistema casero basado en una cámara CCD de alta sensibilidad Retiga EXi de Qimaging Inc, (Burnaby, Canadá, EE. UU) situada ortogonalmente para la lectura de la fluorescencia (Mira et al., 2004), con LEDs Toshiba TLOH157P como fuente de excitación (λ=633 nm) (Llorente et al., 2004). Las medidas se realizaron por acumulación de luz emitida por las muestras durante 8 segundos utilizando una ganancia del dispositivo CCD igual a 3.

Para el análisis y posterior cuantificación de las imágenes de los *microarrays* obtenidos se utilizó el paquete informático GenePix Pro 4.0 suministrado por Molecular Devices, Inc. (Sunnyvale, CA, EEUU).

Para la activación de los chips y para catalizar las reacciones entre los fragmentos y la superficie empleó el instrumento UV-Ozone Cleaning System de la casa comercial FHR (Ottendorf, Okrilla, Alemania), una lámpara de mercurio Double Bore® Lamp de la casa comercial Jelight Co. (California) y una lámpara para cromatografía de capa fina de la casa Vilber Lourmat (Francia). Todas ellas con emisión a 254 nm.

3. MÉTODOS

3.1 Activación de la superficie de vidrio

El primer paso previo a cualquier tratamiento de silanización consistió en la activación de la superficie de vidrio de los portaobjetos. Para ello, se introducen 7 minutos en el ozonizador el cual irradia los chips a una ʎ = 254 nm.

3.2 Funcionalización de la superficie de vidrio

- Procedimiento A

A partir de los portaobjetos de vidrio activados, el siguiente paso consiste en la realización de la técnica conocida como *spin coating*. Los portaobjetos son colocados dentro del Spin Coater, siguiendo las instrucciones del fabricante debe de haber una atmosfera de argón (4 bar) y una fuente de vacío. Se diseña un programa que consiste en 3 pasos:

1. 10 segundos a 350 rpm.
2. 60 segundos a 1.500 rpm.
3. 30 segundos a 10.000 rpm.

En el momento en el que se inicia el giro se depositan 45 µL de viniltrimetoxisilano sobre la superficie del portaobjetos. Terminado el programa, se llevan a una estufa a 110 °C durante una hora para curar la superficie.

Transcurrido este tiempo, los portaobjetos son lavados con isopropanol y secados con aire comprimido. Tras esto, los portaobjetos ya pueden ser cortados en piezas de 2x1 cm aproximadamente para realizar ensayos de inmovilización.

3.3 Marcaje de la BSA

Se preparan 0,5 mL de disolución de BSA a una concentración de 2 mg/mL en PBS 1× a partir de BSA pura, a esta dilución se le añaden 50 µL de tampón bicarbonato sódico 1 M.

Se emplea un vial de *Alexa Fluor® 647* que contiene 100 µg al cual se le adicionan 10 µL de DMSO. A dicho vial se le añaden los 500 µL de la disolución preparada anteriormente de BSA y se deja agitando 2 horas a temperatura ambiente.

Para eliminar el exceso de marcador y concentrar la BSA marcada (BSA*) se realiza una ultrafiltración empleando filtros de 30K de ThermoFisher, se realizan seis ciclos. Cada uno de estos ciclos de centrífuga dura cinco minutos a una velocidad de 14.000 rpm a una temperatura de 22 °C. Cada una de las fracciones recogidas se analizó en el espectrofotómetro Nanodrop.

Dado que la BSA* retenida en el filtro se encontraba a una concentración de 20 mg/mL, se realizaron disoluciones de 1:20 y 1:50 para su posterior almacenamiento. Las diluciones fueron analizadas también en el Nanodrop.

3.4 Protocolo de marcaje de la CRP

En primer lugar, se cambia el tampón a 250 µg de CRP ya que viene en 120 µL de TRIS (tiene grupos amino que se unirían al fluoróforo) a un tampón que contiene 400 µL de $NaHCO_3$ 0,1M. Este cambio de tampón se realiza por ultrafiltración empleando filtros de 30K a 12.360 rpm durante 15 minutos a 17 °C. En cada ciclo de lavado se adicionaron los volúmenes de bicarbonato que se muestran a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Volumen empleado en cada ciclo de ultrafiltración.

Ciclo	Volumen de bicarbonato añadido (µL)
1	400
2	400
3	350
4	350

A lo que se queda retenido en la membrana (CRP) se le añaden 25 µL de *Alexa Fluor® 647* activado previamente con 50 µg de DMSO. Se deja el vial que contiene la CRP con la *Alexa Fluor® 647* agitando durante 2 horas a temperatura ambiente.

Para separar la proteína marcada de la proteína sin conjugar, se hacen ciclos de ultrafiltración con filtros de 30K. En cada ciclo de ultrafiltración (12.360 rpm, 15 minutos y 17 °C) se añaden 500 µL de PBS 1×.

El producto final se analiza en el espectrofotómetro Nanodrop, obteniéndose 300 µL a una concentración de 335 µg/mL.

3.5 Protocolo de obtención de fragmentos de anticuerpos

3.5.1 ***Obtención de fragmentos a partir de la α-BSA***:

3.5.1.1 Producción de $F(ab')_2$ con Pepsina

Se prepara 500 µL de una disolución de α-BSA en PBS 1× a una concentración de 1 mg/mL. Se añade la pepsina en la disolución de anticuerpos en la proporción de 2 mg por cada 100 mg de Ab. Para ello, pesamos 10 mg de pepsina en la balanza analítica y hacemos una dilución 1:100 (0,1 mg/mL), cogemos 100 µL (0,01 mg/mL) y se lo añadimos a la disolución de los anticuerpos. Se ajusta el pH entre 3 y 4 con HCl 1 M y Se incuba la reacción a 37 °C durante 7 horas.

Después, se purifica por ultrafiltración con filtros de 50K de Millipore a 4.600 rpm con una duración de 5 minutos cada ciclo. El objetivo es eliminar la pepsina de la disolución, para ello, se hacen 3 ciclos de lavados, al segundo y tercer ciclo de lavado se le añaden 500 µL de PBS 1×.

Tabla 4. Volumen empleado en cada lavado de la ultrafiltración.

Lavado	V PBS 1× (µL)
1	-
2	500
3	500

Después se analizan las fracciones obtenidas en el fluorímetro Nanodrop.

Para asegurarnos de que únicamente tenemos el $F(ab')_2$, se hace una purificación de fracción retenida mediante cromatografía de afinidad empleando una columna de Proteína A. Por último, se analizan los fragmentos obtenidos en la cromatografía de afinidad en el espectrofotómetro Nanodrop.

3.5.1.2 Producción de Half-IgG

En primer lugar, se prepara el tampón de reacción (TR) y el agente reductor (AR). Para preparar el TR se pesan 88,5 mg de EDTA y se diluye en 3 mL de PBS 1× (TR 100 mM), también se hace una dilución 1:10 del mismo para obtener TR 10 mM. Para preparar el AG se pesan 6 mg de 2-MEA y le añadimos 100 µL de TR 10 mM.

A continuación, se parte de 300 µL de α-BSA a una concentración de 4 mg/mL. Se añaden 30 µL de TR EDTA 100 mM, para que la disolución este a 10 mM. Se mezcla la disolución anterior con 30 µL de AR y lo dejamos incubando durante 90 minutos a 37 °C.

Después, se pre-equilibra una D-salting column añadiendo primero PBS 1×, y posteriormente el mismo volumen de TR 10mM. Se deja que la disolución de los IgG con el 2-MEA alcance temperatura ambiente y lo añadimos a la D-salting column.

Se añaden fracciones de 1 mL de TR 10 mM y se recogen alícuotas de 1 mL (se recogen 10 fracciones).

Por último, se analizan dichas alícuotas obtenidas en el Nanodrop.

3.5.1.3 Producción de Fab con *Pierce™ Preparation Kit*

En primer lugar, se prepara el Tampón de digestión (DB). Para ello, se pesan 35 mg de hidrocloruro de cisteína en y se añaden a 10 mL del DB. El pH debe estar en torno 7,0.

A continuación, se equilibra la papaína inmovilizada. Se agita el vial que contiene la papaína. Se quita el tapón de abajo y se añaden 250 µL a la columna de 0,8 mL. Se centrifuga sin la tapa a 7.400 rpm durante un minuto y se elimina el eluído. Se lava la resina con 0,5 mL del DB preparado anteriormente. Se centrifuga a 7.400 rpm durante un minuto, se desecha el eluído y se tapa la columna.
Una vez llegados a este punto, se preparan las muestras de IgG. Se quita el tapón a una *Thermo Scientific Zeba Desalting Column* y se coloca en un tubo de colección de 15 mL. Se centrifuga la columna a 1000 x g durante dos minutos para eliminar la solución de almacenamiento. Se añade 1 mL de Tampón de digestión encima de la resina. Se centrifuga dos minutos a 3.300 rpm y se elimina el eluído. Se repite este paso tres veces más. Se pone la columna en un tubo de recolección nuevo y añadir 500 µL de la muestra de manera lenta. Se pone la tapa y se centrifuga a 3.300 rpm durante dos minutos. Se recoge lo eluído y se tira la columna.
Para generar los fragmentos, se añaden los 500 µL de la muestra a la columna que tenía la papaína inmovilizada y se deja en agitación y a 37 °C durante 5 h. A continuación, se centrifuga un minuto a 7.400 rpm para separar el producto digerido de la resina. Luego, se lava con 500 µL de PBS 1× centrifugando a 7.400 rpm 1 min y se recoge el eluído. Se hacen tres lavados en total, y se obtiene un volumen final aproximado de 1000 µL.
Para purificar los Fab del resto de los productos implicados en la digestión, se centrifuga un minuto a 3.300 rpm una *NAb Protein A Plus Column* para eliminar la solución de almacenamiento. Luego, se equilibra la columna añadiendo 2000 µL de PBS 1× y se tira el eluído. Se repite una vez. Después se añade a la columna los 1000 µL recogidos anteriormente y se tapa la columna y se mantiene 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se quitan los tapones y se centrifuga un minuto y se recoge el eluído que es donde se encontrarán los Fab. Para una mejor recuperación, se lava la columna con 1000 µL de PBS 1×, se centrifuga un minuto y se añade a la fracción eluída anterior. Se repite este paso una vez más. Después de esto, se añaden 1000 µL de IgG *elution buffer* y se centrifuga un minuto. Se repite este paso dos veces más. Se añaden 100 µL de PBS-Básico a cada fracción recogida, en estas fracciones estarán las IgG y las Fc.

3.5.2 ***Obtención de fragmentos a partir de la α-CRP.***

3.5.2.1 Producción de F(ab')$_2$ *Pierce Mouse IgG$_1$ Fab and F(ab')$_2$ Micro Preparation Kit.*

En primer lugar, se prepara el Tampón de digestión (DB). Para ello, se pesan 7 mg de hidrocloruro de cisteína en y se añaden a 10 mL del DB. El pH debe estar en torno 5,9.
A continuación, se equilibra la ficina inmovilizada. Se agita el vial que contiene la ficina. Se quita el tapón de abajo y se añaden 200 µL a la columna de 0,8 mL. Se centrifuga sin la tapa a 7.400 rpm durante un minuto y se elimina el eluído. Se lava la resina con 0,5 mL del DB preparado anteriormente. Se centrifuga a 7.400 rpm durante un minuto, se tira el eluído y se tapa la columna.
Una vez llegados a este punto, se preparan las muestras de IgG. Se quita el tapón a una *Thermo Scientific Zeba Desalting Column* y se coloca en un tubo de colección de 1,5-2 mL. Se centrifuga la columna a 4.000 rpm durante un minuto para eliminar la solución de almacenamiento. Se añaden 300 µL de Tampón de digestión encima de la resina. Se centrifuga un minuto a 4.000 rpm y se elimina el eluído. Se repite este paso tres veces más. Se pone la columna en un tubo de recolección nuevo y añadir 125 µL de la muestra

de manera lenta. Se pone la tapa y se centrifuga a 4.000 rpm durante dos minutos. Se recoge lo eluído y se tira la columna.

Para generar los fragmentos, se añaden los 125 µL de la muestra a la columna que tenía la ficina inmovilizada y se deja en agitación y a 37 °C durante 25 horas. A continuación, se centrifuga un minuto a 7.400 rpm para separar el producto digerido de la resina. Luego, se lava con 125 µL de PBS 1× centrifugando a 7.400 rpm 1 min y se recoge el eluído. Se hacen tres lavados en total, y se obtiene un volumen final aproximado de 500 µL. Los volúmenes de los distintos lavados no se mezclan, se trata cada fracción por separado.

Para purificar los $F(ab')_2$ del resto de los productos implicados en la digestión, se centrifuga un minuto a 1000 x g una *NAb Protein A Plus Column* para eliminar la solución de almacenamiento. Luego, se equilibra la columna añadiendo 400 µL de PBS 1× y se tira el eluído. Se repite una vez. Después se añade a la columna el volumen correspondiente recogido en cada fracción y se tapa la columna y se mantiene 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se quitan los tapones y se centrifuga un minuto y se recoge el eluído que es donde se encontrarán los $F(ab')_2$. Para una mejor recuperación, se lava la columna con 200 µL de PBS 1×, se centrifuga un minuto y se añade a la fracción eluída anterior. Se repite este paso una vez más. Después de esto, se añaden 400 µL de IgG tampón de elución y se centrifuga un minuto. Se repite este paso dos veces más. Se añaden 40 µL de PBS-Básico a cada fracción recogida, en estas fracciones estarán las IgG y las Fc.

Por último, se analizan las fracciones recogidas en el espectrofotómetro Nanodrop.

Para regenerar la columna con Proteína A Inmovilizada. Se añaden 400 µL de *IgG Elution Buffer* y se centrifuga un minuto. Se desecha el sobrenadante. Se repite este paso una vez más. A continuación, se añaden 400 µL de PBS 1× a la columna y se centrifuga un minuto. Se repite este paso tres veces más. Se tapa la columna y añadir 400 µL de azida sódica (0,02%) para almacenar la columna.

3.6 Caracterización de los fragmentos de IgG por electroforesis de proteínas.

Se preparan 30 µL de las muestras para caracterizar por electroforesis a una concentración mínima de 1 µg por cada 10 µL. La electroforesis se realizará en condiciones no reductoras tanto calentando como sin calentar.

Las muestras se preparan de la siguiente manera:

1. 10 µL de la muestra
2. 7,5 µL de Agua Milli-Q
3. 2,5 µL de LDS

Preparamos las muestras, dos de cada fragmento de Ab a caracterizar, una de las dos muestras de cada fragmento se calientan a 57 °C durante 10 minutos, las otras muestras no se calientan.

Se monta la cubeta de electroforesis. Se prepara una dilución del tampón de electroforesis MOPS, para ello, se añaden 50 mL de MOPS y se enrasa hasta 1 L con agua destilada. Se llena la cubeta con la disolución preparada anteriormente, primero la cabina central para ver que está estanca y luego el resto. Añadir 500 µL de antioxidante a la cámara central. Colocar la cubeta de

electroforesis y conectarla a la fuente de alimentación para comprobar que está bien. Se aplican 200 V durante 1-1:30 horas.

Se cargan 7 µL del patrón de pesos moleculares SiBlue y 20 µL de nuestras muestras. Se deja correr la electroforesis. A continuación, se saca el casette y se quita el plástico con la espátula. Se corta la parte de abajo y el peine haciendo incisiones. Se cortan también los laterales con la esquina de la espátula. Después se tiñe el gel con azul de Comassie de manera que cubra bien el gel, se deja durante 1 hora en agitación. Se lava con agua destilada. Por último, se hacen 3 lavados con MeOH (40%) y ácido acético (10 %) para eliminar el exceso de tinte. Cada lavado es de 15 minutos en agitación y se lava con agua destilada.

3.7 Protocolo de impresión e inmovilización de los anticuerpos en el *microarray* y reacción de reconocimiento con la proteína marcada.

En primer lugar, las diluciones a imprimir se cargan en una placa de 384 pocillos. La impresión es llevada a cabo mediante el robot de impresión sin contacto Biodot. Para ello, se coloca la placa de 384 pocillos en el Biodot, se abre el vacío y se conecta la humedad que debe estar al 90%. Se selecciona el programa adecuado para el experimento que se va a realizar, siendo las zonas el número de chips, las líneas el número de reactivos y los spots el número de réplicas para cada reactivo.

El *microarray* diseñado se imprime sobre los chips derivatizados como grupos vinil tal y como se indica anteriormente. Tras la impresión, se dejan secar las gotas a temperatura ambiente, y luego, se irradian a 254 nm durante 30 segundos. Tras irradiar los chips a una longitud de onda de 254 nm, se deja que adsorban diez minutos en oscuridad. Después de esto, se lavan los chips con PBS-T y agua destilada y se secan con aire comprimido.

Para el correcto reconocimiento de la proteína por parte de los fragmentos de anticuerpo, se añaden 12,5 µL de la disolución de proteína marcada con el fluoróforo *Alexa Fluor® 647* en PBS-T a cada chip. Para asegurar que la solución que contiene la proteína marcada se extienda de manera adecuada, se cubre el chip con un cubreobjetos. Una vez depositada la solución con la proteína marcada, para que se produzca el reconocimiento, se deja el chip en oscuridad durante media hora a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se retira el cubreobjetos con cuidado y se lava el chip con PBS-T y agua destilada y, por último, se seca con aire comprimido.

3.8 Lectura y análisis de detección

Una vez los chips han sido lavados como se indica anteriormente después de ser incubados, se analizan en una cámara CCD. Las imágenes que se obtienen en dicha cámara se tratan con el software *Genepix* que nos ofrece datos que posteriormente se plasman es un hoja Excel para obtener los resultados finales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RESULTADOS DEL MARCAJE FLUORESCENTE DE LAS PROTEÍNAS A DETECTAR: ALBÚMINA DE SUERO BOVINO (BSA) Y PROTEÍNA C-REACTIVA (CRP)

Para poder cumplir con los objetivos de este TFG, en primer lugar se empieza trabajando con un modelo policlonal, como es el sistema BSA/αBSA. La optimización de este modelo servirá como paso clave en la puesta a punto del modelo monoclonal que en este caso es el sistema CRP/αCRP.

Dado que se va a trabajar con metodologías de *microarray* de fluorescencia se requiere un fluoróforo, como es el Alexa Fluor® 647 NHS éster, para marcar los analito. Dicho fluoróforo se excita a una longitud de onda de 651 nm y emite a 672 nm, el marcaje de la BSA y de la CRP se hizo con este reactivo.

Para ambos marcajes se siguieron las indicaciones del fabricante, en el caso de la BSA, se tenía experiencia previa en el laboratorio, y el protocolo ya estaba bastante estandarizado. El método consistió en poner en contacto el biomarcador y el tinte durante dos horas en agitación para que el fluoróforo se uniera a los grupos $-NH_2$ de las proteínas. Para separar la proteína marcada del fluoróforo sin reaccionar se realizaron ciclos de ultrafiltración y posteriores lavados con PBS también por ultrafiltración, hasta que el filtrado no reveló presencia del marcador en el espectrofotómetro, se necesitaron un total de 6 lavados.

Dado que el peso molecular de la BSA es de 66 kDa y se empleó un filtro de 30 kDa para la purificación se esperaba que la gran mayoría de proteína marcada se encontrara en la fracción retenida. Puesto que el retenido estaba muy concentrado, antes de medir su concentración en el espectrofotómetro, se hicieron diluciones 1:20 y 1:50 (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de la BSA* (BSA marcada) y cantidad de *Alexa Fluor® 647* presente en cada fracción medido con Nanodrop.

	[BSA] (mg/ml)	**[AlexaFluor647] (µM)**
Dilución 1:20	0,97	30,1
Dilución 1:50	0,4	13,5

A partir de los resultados obtenidos se calculó la relación de marcaje, es decir, la cantidad de moléculas de marcador por cada molécula de BSA, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Para la dilución 1:20 se obtuvo una relación de marcaje de 2,05 moléculas de *Alexa Fluor® 647* por cada molécula de BSA. Para la dilución 1:50 se obtuvieron 2,23 moléculas de *Alexa Fluor® 647* por cada molécula de BSA.

Para comprobar cuál era la cantidad mínima y máxima de BSA* que se podría detectar en nuestros experimentos (empleando metodología de *microarray* y midiendo la fluorescencia con nuestro sistema de lectura casero) se realizó una recta de calibrado (Figura 12a). Para ello, sobre un porta de vidrio se imprimió un *microarray* de 8×4 puntos, con concentraciones crecientes de BSA* (Figura 12b) y se registró la fluorescencia con el lector de fluorescencia de superficies casero. La fluorescencia obtenida se representó frente a la concentración de BSA* obteniendo una curva de saturación, de la cual se escogió el tramo lineal para representarlo y realizar el ajuste obteniendo la recta de calibrado (Figura 13).

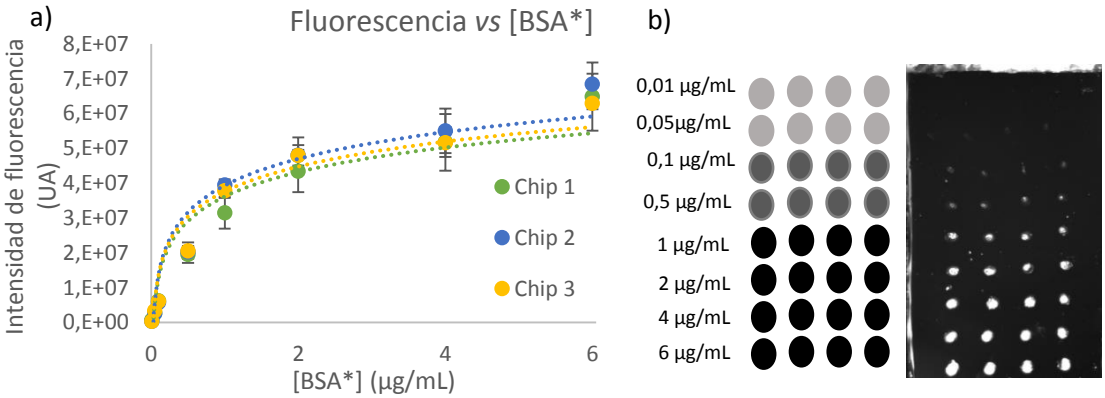

Figura 12: a) Curva de saturación de BSA* b) Representación esquemática del *microarray* creado (izquierda), y lectura de fluorescencia del chip (derecha).

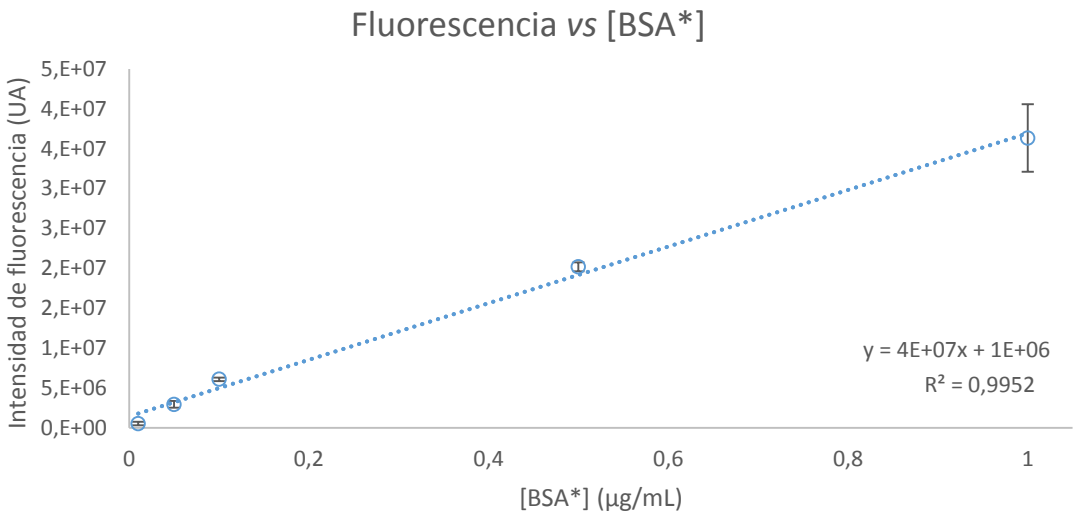

Figura 13: Recta de calibrado de BSA*.

En el caso de la CRP el marcaje se llevó a cabo de la misma manera que el de BSA, empleando también filtros de 30K de ThermoFisher para la purificación pero en este caso el proceso de ultrafiltración y lavado no fue igual de eficaz perdiéndose mucho fluoróforo en las filtraciones. Al final de los lavados, en el retenido se obtuvieron 300 µL a una concentración de 335 µg/mL. Conforme a estos resultados podemos observar cómo se pierde una gran cantidad de masa en el proceso de ultrafiltración ya que partíamos de 250 µg y obtuvimos aproximadamente unos 100 µg, con lo que el rendimiento del proceso fue aproximadamente de un 40%.

La relación de marcaje en el caso de la CRP resultó ser de 5,64 moléculas de *Alexa Fluor® 647* por cada molécula de CRP.

De la misma forma que se realizó la recta de calibrado para la BSA* también se realizó para la CRP* (CRP marcada) (Figura 14).

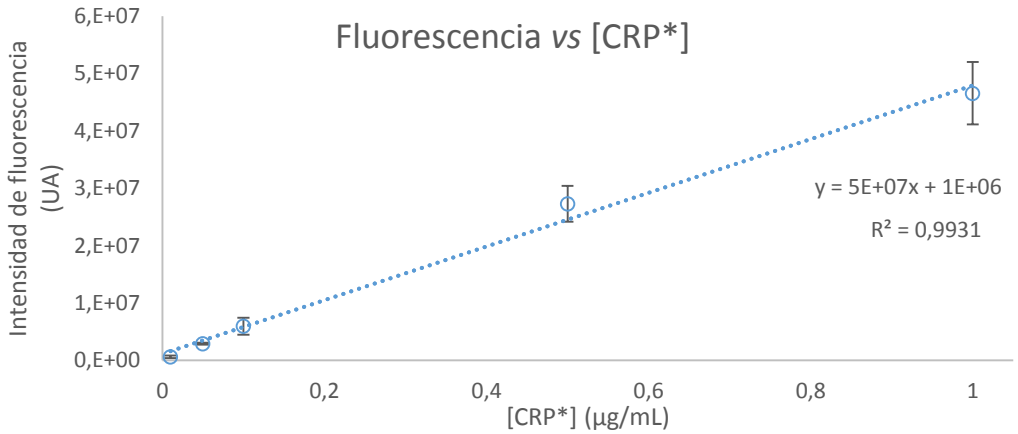

Figura 14: Recta de la calibrado de CRP*.

2. PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA MODELO POLICLONAL BSA/ANTI-BSA

2.1 Optimización de la funcionalización de la superficie

En primer lugar hubo que funcionalizar los soportes de vidrio de manera que se dispusiesen grupos vinil en la superficie. Se escogió vidrio como material de trabajo porque resulta un material económico, de buenas propiedades ópticas y responde a la funcionalización química con organosilanos de manera muy similar a cómo lo hace el óxido de silicio, o el SOI (*silicon on insulator)*, materiales típicos de fabricación de las guías de ondas que constituirán el dispositivo final de PHOCNOSIS.

Al principio de este trabajo, por la experiencia que tenía este grupo de investigación en el tratamiento de las superficies de vidrio, se conocía que era necesario exponer los portaobjetos de vidrio 7 minutos a una λ = 254 nm en un ozonizador para activar las superficies frente a la silanización. Esta activación consiste en que los grupos hidroxilos (-OH) pasen a estar más accesibles ya que aumenta su número y se disponen en la superficie del chip (Figura 15). El aumento en la concentración de grupos alcohol provoca un aumento de la hidrofilia en la superficie, por lo que el grado de activación de la superficie se puede monitorizar mediante la medida del ángulo de contacto. En este caso, tras la activación se pasó de un ángulo de 40° antes de la irradiación a un ángulo prácticamente igual a cero tras la irradiación.

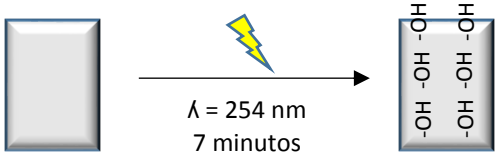

Figura 15: Esquema del proceso de funcionalización de la superficie de vidrio mediante irradiación.

La derivatización de las superficies se llevó a cabo mediante *spin coating* con viniltrimetoxisilano ya que resultaba más sencilla, más rápida y menos contaminante que la derivatización mediante inmersión en una dilución del organosilano en un disolvlente orgánico, los chips generados tenían además un ángulo de contacto más homogéneo (Figura 16).

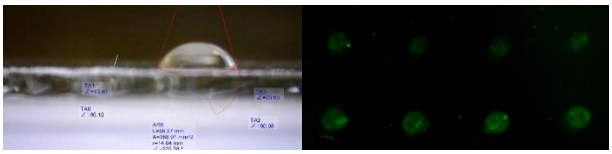

Figura 16: En la parte izquierda de la imagen se muestra el ángulo de contacto de una gota de agua Milli-Q sobre la superficie funcionalizada con viniltrimetoxisilano y, a la derecha, la imagen de un chip con dicha funcionalización y un *microarray* de BSA* generado sobre él.

Dados los resultados de la funcionalización, el protocolo final que se estableció fue la activación en el ozonizador durante 7 minutos más una silanización de las superficies de vidrio mediante *spin-coating* con viniltrimetoxisilano seguido de proceso de curado en estufa a 110 °C durante 1 hora y lavado (Figura 17).

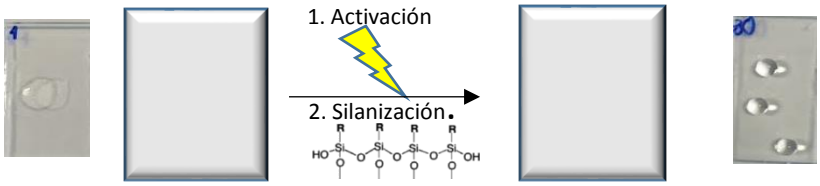

Figura 17: Protocolo final de activación y funcionalización de superficies que se sigue en el dicho TFG.

2.2 Obtención de los fragmentos de anticuerpos y caracterización

En el proceso de obtención de un fragmento de anticuerpo que tuviera una mayor sensibilidad que el anticuerpo sin fragmentar y que se uniera de manera eficiente a la superficie se estudiaron varios abordajes. Recordamos que lo que se buscaba era generar un fragmento que tuviera los tioles (-SH) de la región bisagra libres o lo más accesibles posibles, para que mediante el uso de reacciones fotoinducidas se produjera la reacción del tiol-eno con la superficie previamente silanizada y así lograr un anclaje orientado que permitiera tener los parátopos dispuestos de manera que pudieran reconocer de manera óptima a la proteína diana.

Cabe destacar que se empezó empleando un modelo de anticuerpo policlonal para establecer las condiciones óptimas del proceso y, posteriormente, poder trasladarlo a anticuerpos monoclonales. La razón de comenzar con un sistema policlonal fue su menor precio, que lo hacía más accesible en mayores cantidades para el proceso de optimización.

Lo primero que se intentó fue obtener los *Half-IgG* ya que disponen de los tioles de la región bisagra libres. Para ello se usó un agente reductor, 2-mercaptoetilamina (MEA), comercializado por la casa Fisher específicamente para esta finalidad. Los fragmentos se aislaron mediante el empleo de una D-salting column. (Tabla 6):

Tabla 6: Resultados obtenidos tras hacer la reducción con 2-MEA (medidas obtenidas en el Nanodrop). H-A: Distintas fracciones que se obtuvieron en la columna de desalado para recoger los *Half-IgG.*

	[IgG] mg/mL
H-A3	0,304
H-A4	0,371

Se obtuvo 1 mL de cada una de las dos fracciones mayoritarias (H-A3 y H-A4), por lo tanto, en total se recuperaron 0,675 mg de *Half-IgG*, dado que se había partido de 300 µL de anticuerpo completo a una concentración 4 mg/mL (1,2 mg de Ab), el rendimiento de recuperación de la disrupción fue del 56,25%.

Por otro lado, se empleó un kit comercial de la casa ThermoFisher (*Pierce™* Fab *Preparation Kit*) para obtener fragmentos Fab. El fragmento Fab consiste en la región que se une al antígeno compuesta por una V_H, C_{H1} y V_L, y regiones C_L. Este abordaje se llevó a cabo ya que se conocía que grupos de investigación han conseguido obtener Fab y anclarlos a la superficie haciendo uso de sus grupos tiol (Parracino et al., 2010). Estos fragmentos anclados eran capaces de reconocer a su antígeno, en este caso proteína PSA. En la digestión enzimática de la antiBSA con papaína los resultados obtenidos se recogen en la tabla que se muestra a continuación (Tabla 7):

Tabla 7: Resultados obtenidos tras realizar la digestión con papaína (Kit ThermoScientific). Fab 1: Primera fracción Fab obtenida después de la realización de la purificación de los mismos con una columna de proteína A. Fab 2: Segunda fracción Fab obtenida después de la realización de la purificación de los mismos con una columna de proteína A.

	[Concentración] (mg/mL)	Volumen (mL)
Fab 1	0,2925 ± 0,02	2
Fab 2	0,037 ± 0,002	1

Se partió de 500 µL de anticuerpo a una concentración de 2 mg/mL, esto es 1 mg de anticuerpo, dado que solo nos quedamos con dos tercios de la masa de anticuerpo (dos Fab) como máximo se pueden obtener 0,666 mg y se obtuvieron 0,622 mg por lo que el rendimiento de la digestión fue del 93,3 %.

El último abordaje que se llevó a cabo fue la obtención de $F(ab')_2$ mediante el empleo de pepsina en suspensión. El motivo por que el que se querían obtener estos $F(ab')_2$ es porque poseen los puentes disulfuro de la región bisagra más accesibles para que mediante una fuente de luz a una λ de 254 nm, se rompan quedando los tioles libres para poder reaccionar con los grupos vinil que se encuentra en la superficie de vidrio, y que fuera capaz de anclarse a este mediante la reacción del tiol-eno. La digestión con la enzima duró 7 horas a una temperatura de 37°C. Tras ello se hizo una purificación con un filtro de 50K para separar el $F(ab')_2$ de la Fc y, por último, con una columna de proteína A se separaron los anticuerpos enteros de los $F(ab')_2$. Los resultados de dicha digestión fueron los siguientes (Tabla 8 y 9):

Tabla 8: Resultados de la digestión tras filtrar las fracciones obtenidas en un filtro de 50k de ThermoScientific. Lavado: Fracciones recogidas en los lavados realizados en el filtro de 50K. Retenido: Producto retenido en el filtro tras los ciclos de lavado.

	$F(ab')_2$ (mg/mL)	Volumen (µL)	
Lavado 1	0,11	-	
Lavado 2	0,11	-	**RENDIMIENTO**
Retenido	6,22	64	**79,62%**

Tabla 9: Resultados finales de la digestión tras pasar el retenido por una columna de proteína A y rendimientos de la cromatografía de afinidad y total de proceso de digestión. $F(ab')_2$: Distintas fracciones recogidas en la columna de proteína A. IgG: Distintas fracciones de anticuerpo recogidas tras romper la interacción con la columna.

	Cantidad de proteína (mg/mL)	V (mL)	RENDIMIENTO	RENDIMIENTO TOTAL
$F(ab')_2$ 1	0,021	1	**38,57%**	**30,70%**
$F(ab')_2$ 2	0,216	0,5		
$F(ab')_2$ 3	0,049	0,5		
IgG 2	0,095	1	**37,69%**	
IgG 3	0,055	1		

Una vez obtenidos todos los fragmentos se procedió a su caracterización a través de una electroforesis de proteínas SDS-PAGE en condiciones tanto reductoras como no reductoras. En los primeros intentos de caracterización se tuvieron problemas con los tampones en los que se encontraban los fragmentos a caracterizar por lo que los resultados obtenidos no eran del todo fiables, además el tiempo que el gel estuvo corriendo fue excesivo por lo que su interpretación resulta aún más compleja (Figura 18).

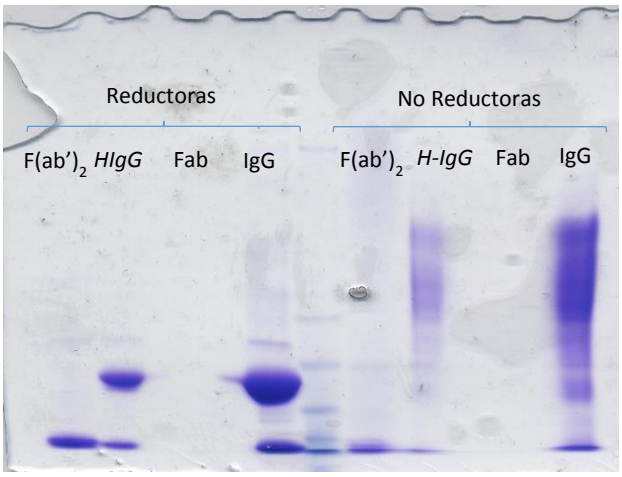

Figura 18: Imagen del resultado de la electroforesis de proteínas con NuPAGE Geles Bis-Tris. Los resultados de este gel no son fiables ya que las muestras no se estaban lo suficientemente purificadas.

Como se puede observar en el gel de electroforesis, el *Half-IgG* muestra las mismas bandas que el anticuerpo entero. Lo que nos hizo cuestionar si la digestión con la 2-MEA había sido efectiva o si los fragmentos se habían vuelto a hibridar volviendo a formar el anticuerpo entero de nuevo. No pudimos saber si dichos fragmentos eran de verdad los *Half-IgG* ya que la medida en Nanodrop tampoco era capaz de diferenciar entre el anticuerpo entero y dichos fragmentos.

Los Fab obtenidos con el kit comercial Fab *Preparation Kit* de Pierce no mostraron ninguna banda en la electroforesis, ni en condiciones no reductoras ni en reductoras. Esto podía ser debido o a que la digestión no se llevó a cabo de manera correcta o que en la realización de la electroforesis se cargó una muestra a una concentración más baja de lo recomendado para una correcta visualización de las bandas.

Por último, en el caso del $F(ab')_2$ se observa en condiciones no reductoras una pequeña banda a unos 50 kDa pero en el caso de dichos fragmentos la banda debería ser a 110 kDa, también se leyó en la bibliografía que los $F(ab')_2$ obtenidos de conejos deberían de verse como una banda a 88 kDa. No obstante, no se obtuvieron ninguna de las dos bandas, el problema pudo deberse a que la muestra no estuviese lo suficientemente pura o que llevase restos de algún tampón, como puede ser el tampón glicina-HCl que se emplea para aislar los IgG de todo el antisuero.

Con todos estos fragmentos, se probó a hacer varios ensayos en chips a diferentes concentraciones variando también el tiempo de exposición a una luz con una λ = 254 nm. El objetivo de estos ensayos era determinar si los fragmentos preparados eran capaces de inmovilizarse de una manera biodisponible en el chip. Para ello se imprimieron a distintas concentraciones y tras la irradiación y lavado, se realizó el reconocimiento con la BSA marcada, registrando la fluorescencia tras el lavado.

Dado el orden cronológico en el cual se empezaron a realizar los distintos experimentos, en primer lugar, se probaron los *Half-IgG*. Para comprobar si éstos eran capaces de reconocer a la BSA se llevó a cabo un experimento que consistía en imprimir 2 chips siguiendo el esquema que se muestra a continuación (Figura 19a). Ambos chips se irradiaron 30 segundos en el ozonizador a una ʎ = 254 nm y fueron lavados con PBS-T y agua. En este caso la incubación fue con BSA* a 10 µg/mL.

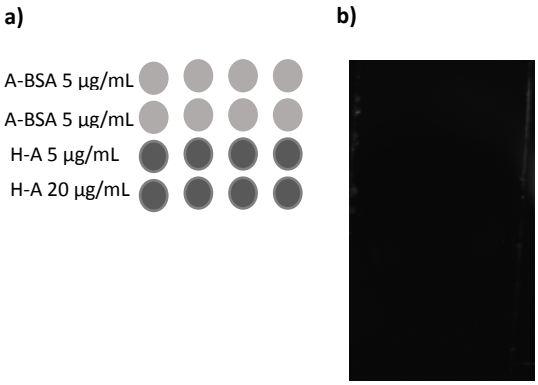

Figura 19: a) Esquema del experimento realizado. b) Imagen obtenida en la cámara CCD tras incubar con la BSA*.

A la vista de los resultados, los *Half-IgG* se descartaron del estudio porque, por un lado no se tenía la certeza de que se hubiesen obtenido los fragmentos y por otro lado, no se logró inmovilizarlos efectivamente bajo ninguna de las condiciones probadas. Se centró, a partir de este momento el estudio en los fragmentos Fab y $F(ab')_2$.

A continuación, los siguientes fragmentos que se obtuvieron fueron los Fab y los $F(ab')_2$. Se hicieron varios ensayos con dichos fragmentos. En el primer ensayo donde se obtuvieron resultados positivos se funcionalizaron los chips con viniltrimetoxisilano y se hizo un *array* de 7×4 puntos que contenía $F(ab')_2$, Fab e IgG a distintas concentraciones. Posteriormente, estos chips se irradiaron a distintos tiempos para promover el anclaje mediante la reacción de tiol-eno. Después del lavado, los chips se incubaron con BSA* a una concentración de 5 µg/mL durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras esto, se registró la fluorescencia (Figura 20). Inicialmente se probaron concentraciones pequeñas de bioreceptor, que proporcionaron resultados negativos por lo que se probó a aumentar la concentración de impresión, observando, en este caso, reconocimiento de BSA* por parte de los receptores impresos a mayores concentraciones (Figura 21).

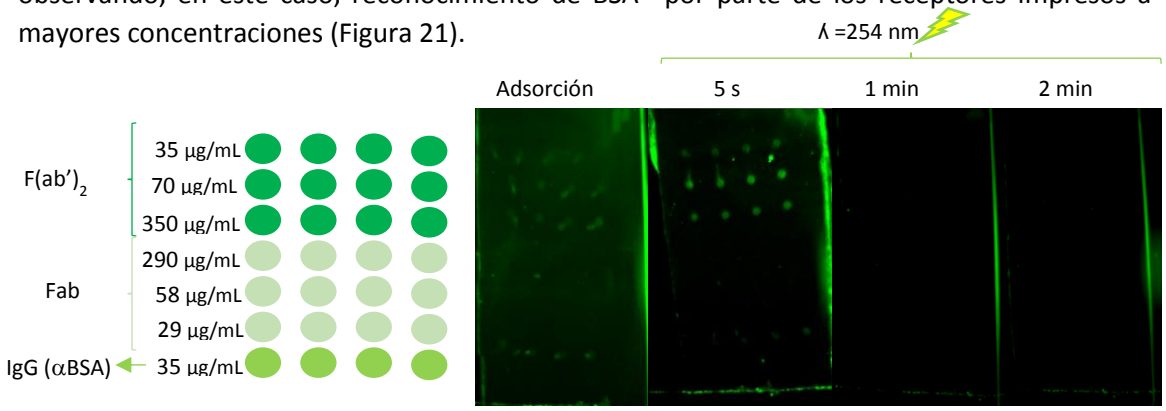

Figura 20: Esquema del *microarray* generado para este experimento y resultado después de tratar las imágenes con el software Genepix y. Se observa como el $F(ab')_2$ reconoce mejor a la BSA* ya que da una intensidad de fluorescencia mayor que el IgG sin fragmentar. Así mismo, se puede observar cómo en este experimento, el tiempo óptimo de irradiación se encuentra alrededor de los 5 segundos, ya que a tiempo de exposición mayores como son 1 o 2 minutos no se observa reconocimiento ni por parte del $F(ab')_2$ ni del anticuerpo completo.

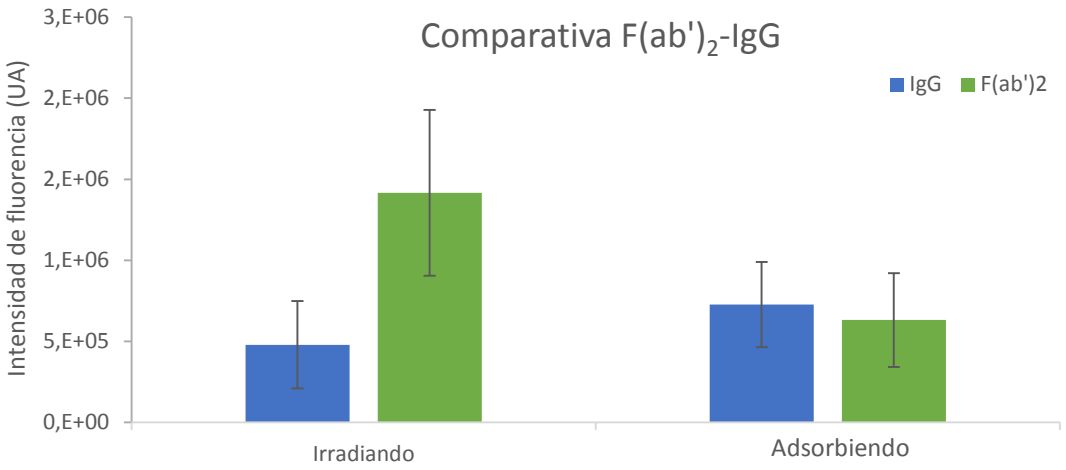

Figura 21: En esta gráfica se puede observar la diferencia de intensidad de fluorescencia entre el $F(ab')_2$ y el IgG. Se muestran las diferencias en dos condiciones distintas, cuando el chip se irradia y cuando se deja adsorbiendo. Se observa que el mejor resultado se produce cuando se irradia el $F(ab')_2$.

En las figuras que se muestran anteriormente (Figura 20 y Figura 21), se puede observar cómo el fragmento $F(ab')_2$ tiene un mejor reconocimiento de la proteína marcada que el anticuerpo completo, y además, cuando los chips son irradiados, se obtiene un mejor reconocimiento que cuando los receptores se inmovilizan por adsorción. Por ello, se optó por centrar los esfuerzos en el $F(ab')_2$ y, en menor medida en el Fab con el que se realizó un experimento empleando la benzofenona como fotoiniciador, pero no se obtuvo resultado alguno. El Fab, probablemente al romper algún puente disulfuro para unirse a la superficie, se desnaturaliza perdiendo su capacidad de reconocimiento. En el caso del $F(ab')_2$ la irradiación favorece el anclaje ya que se observan unos puntos más redondos y homogéneos (enlaces covalentes) que cuando solo se dejan adsorber. Además este tipo de anclaje (adsorción física) con el lavado se debilita provocando que los puntos en el *array* se desplacen y aparezcan "arrastrados" dado que la unión sonda-superficie es mucho más débil y menor robusta que el enlace covalente.

Puesto que el fragmento $F(ab')_2$ era el que mejor resultados producía y el que mayor sensibilidad aportaba al experimento, el abordaje que se siguió fue intentar obtener los fragmentos lo más puros posibles para observar si con ello aumentaba el rendimiento del proceso y ver si se producía una mejor caracterización por electroforesis. Además, permitía evaluar la reproducibilidad del proceso global. Se procedió por tanto a preparar de nuevo $F(ab')_2$ y se caracterizó por electroforesis (Figura 22).

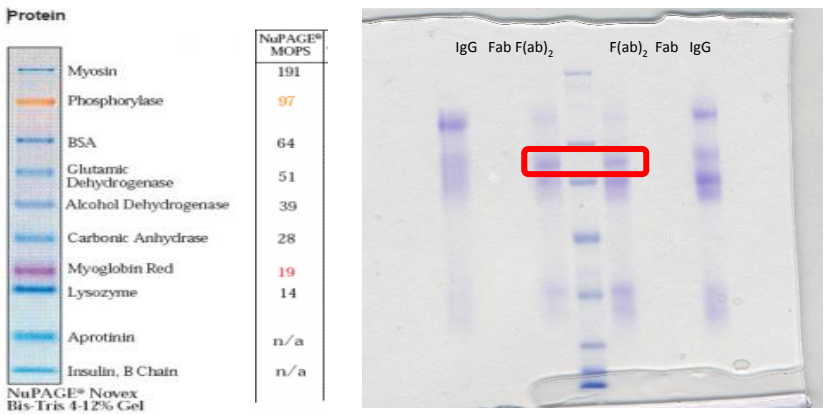

Figura 22: A la izquierda, el marcador de pesos moleculares. A la derecha, gel del resultado de la electroforesis de proteínas, a la izquierda del marcador de pesos moleculares los fragmentos se encuentran en condiciones no reductoras y a la derecha del mismo se encuentran en condiciones reductoras.

Se puede observar cómo en este caso, al estar los fragmentos más puros y con un tampón más homogéneo (PBS 1×), el gel de electroforesis está más limpio y las bandas se pueden apreciar mejor. Tal y como se indicaba anteriormente, se observa una banda a 88 kDa que es donde deberían encontrarse los fragmentos F(ab')$_2$ obtenidos de conejo, por lo que en este caso sí que se podría afirmar que se ha obtenido dicho fragmento.

2.3 Optimización del tiempo de irradiación

Una vez sabiendo con qué fragmentos había que continuar la investigación, se hicieron pruebas para optimizar el reconocimiento del biomarcador. Por lo que se estudiaron diferentes tiempos de irradiación de los chips para observar cuál de ellos era el más adecuado y de esta manera poder establecer un protocolo para los siguientes experimentos (Figura 23).

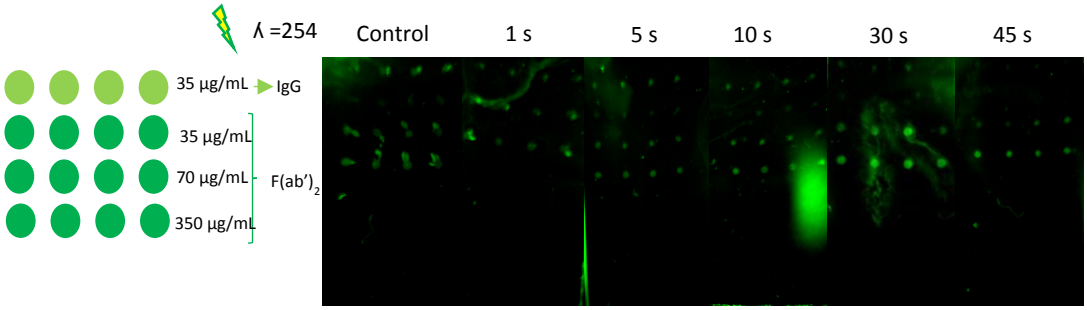

Figura 23: Experimento de optimización del tiempo de irradiación adecuado para el experimento. Se imprimieron 8 *microarrays* de 4×4 empleando distintas concentraciones de F(ab')$_2$ e IgG y se irradió cada chip a un tiempo distinto. El chip que mejor resultado obtuvo fue el que se irradió 30 segundos.

Dados los resultados obtenidos, tanto por la sensibilidad como por la calidad del punto, se eligió irradiar los chips 30 segundos en el ozonizador más una incubación de 10 minutos en oscuridad. Este periodo de oscuridad, tras la irradiación, permitiría actuar a los radicales tiol generados, aumentando el rendimiento de la reacción tiol-eno.

Este experimento demostró que el F(ab')$_2$ mejora al anticuerpo entero incluso cuando se trata solo de adsorción.

2.4 Estudio de la capacidad de reconocimiento del biomarcador

Una vez el tiempo de irradiación estaba establecido, se decidió probar qué concentración mínima de BSA* eran capaces de reconocer los fragmentos de anticuerpo inmovilizados. Para ello se crearon *microarrays* como el indicado en la Figura 24, y se incubaron con concentraciones decrecientes de BSA* (de 5 a 0,1 µg/mL).

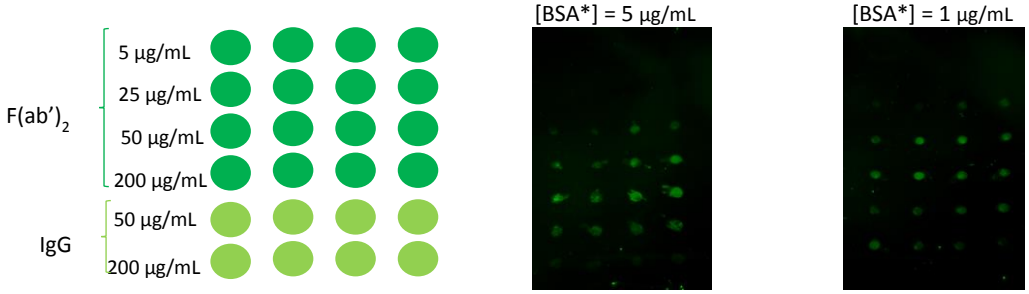

Figura 24: A la izquierda se observa el esquema del experimento y en las fotos, a la derecha, podemos observar el resultado del experimento. En el *array* había tanto F(ab')$_2$ como IgG a distintas concentraciones para poder evaluar la capacidad de reconocimiento a distintas concentraciones, tal y como se puede observar en la figura el fragmento es capaz de reconocer mejor al analito.

Para ampliar el estudio se llevó a cabo otro experimento (Figura 25) en el cual se probaron tanto diferentes concentraciones de F(ab')$_2$ como diferentes concentraciones de BSA*. También se compararon las intensidades de fluorescencia obtenidas en cada chip con el anticuerpo entero (Figura 26).

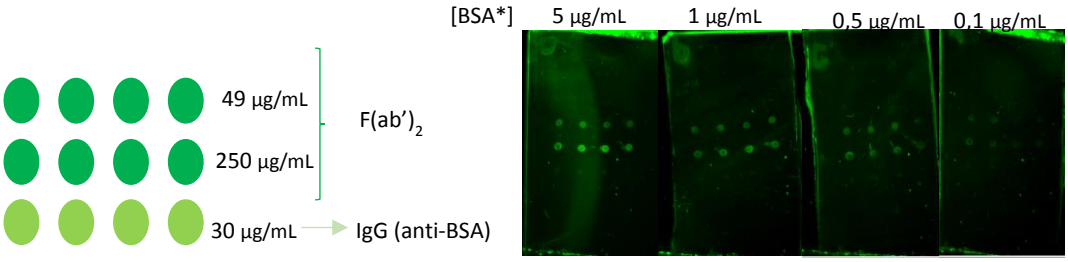

Figura 25: A la izquierda se puede observar el esquema del experimento y a la derecha, se observan los resultados de dicho experimento tras ser incubadas con concentraciones decrecientes de BSA*. En todos los casos el fragmento F(ab')$_2$ reconoce mejor a la BSA* que el anticuerpo.

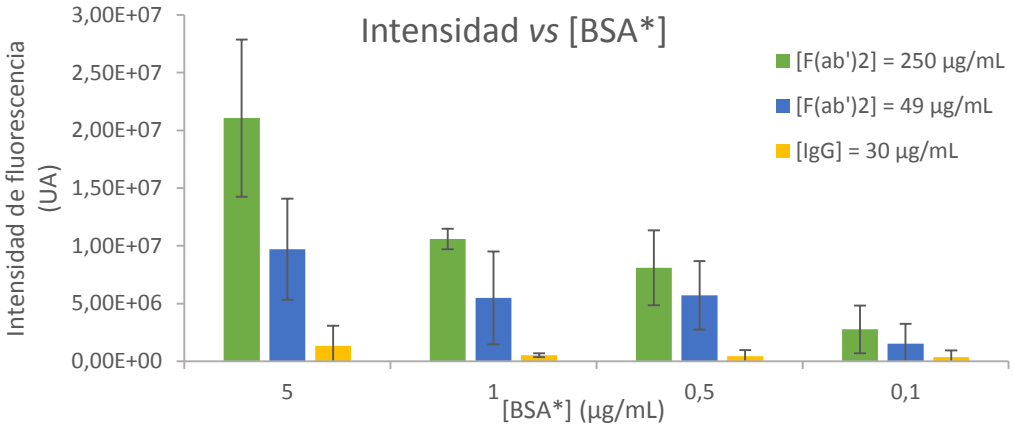

Figura 26: Gráfico de barras en el cual se muestran los valores obtenidos en el experimento anterior. En el cual se muestra que el F(ab')$_2$ tiene una mayor capacidad de unión del biomarcador ya que como se puede observar en el gráfico la intensidad de fluorescencia de dicho fragmento es mayor que la del anticuerpo entero.

Con el objetivo de tener más resultados, se realizó otro experimento en el cual en vez de irradiando se dejaron los chips adsorbiendo toda la noche, y al día siguiente se incubaron con distintas concentraciones de BSA marcada (Figura 27).

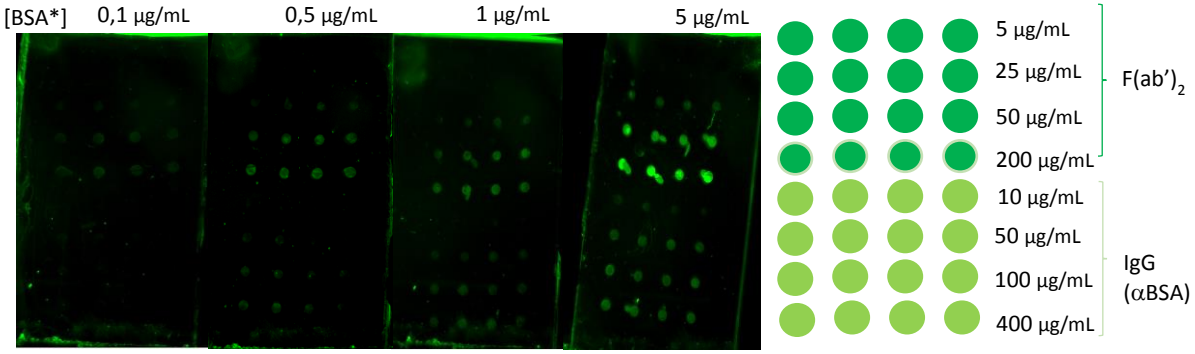

Figura 27: Fluorescencia obtenida para distintas concentraciones de BSA* en *microarrays* inmovilizados por adsorción. Todos los chips se dejaron adsorber toda la noche. Cada uno de ellos, fue tratado con una concentración de BSA* distinta con el objetivo de determinar la mínima concentración de biomarcador podía ser reconocía por el bioreceptor, a la derecha se indica el esquema del *microarray* creado y las concentraciones empleadas para la inmovilización.

Hay que añadir que estos chips pese a que estuvieron adsorbiendo durante toda la noche los puntos se desplazan un poco cuando se realizan los lavados, cosa que no ocurre cuando los chips se irradian ya que la unión que se produce con la superficie es una unión covalente.

Como conclusión de los experimentos realizados con los fragmentos de αBSA, se estableció que los fragmentos $F(ab')_2$ eran los que mejores prestaciones presentaron y se estableció un protocolo de inmovilización rápido y simple consistente en irradiar únicamente durante 30 segundos, seguido de una incubación de 10 minutos tras lo cual los $F(ab')_2$ se inmovilizaron sobre la superficie de manera biodisponible.

3. MODELO MONOCLONAL CRP/ANTI-CRP

Una vez se obtuvieron resultados concluyentes con el sistema policlonal BSA/αBSA, se procedió a realizar un estudio similar con un sistema monoclonal como es el sistema CRP/αCRP. El modelo monoclonal a pesar de ser más caro y de disponer de una cantidad mucho menor por cada lote, es un modelo fiable y muy robusto, ya que ofrece una gran reproducibilidad entre los distintos lotes, además, ofrece una gran especificidad que no se encuentra en la mayoría de los modelos policlonales. Por otro lado, si se piensa en la aplicación final (dispositivo comercial) los receptores a utilizar deberán ser, sin ninguna duda, monoclonales.

3.1 Obtención de los fragmentos de anticuerpos

En primer lugar, para intentar obtener los fragmentos $F(ab')_2$ se empleó el kit *Pierce™ Mouse IgG_1 Fab and $F(ab')_2$ Micro Preparation Kit* de Thermo Scientific el cual emplea ficina como enzima proteolítica para cortar los anticuerpos.

Dado que se había establecido un modelo previamente, se empezaron haciendo pruebas siguiendo el mismo procedimiento que se había establecido en el caso del modelo policlonal.

Se empezó realizando un experimento que consistía en medir la diferencia de intensidad de fluorescencia en función de la variación en el tiempo de irradiación, adsorción e incubación (Figura 28).

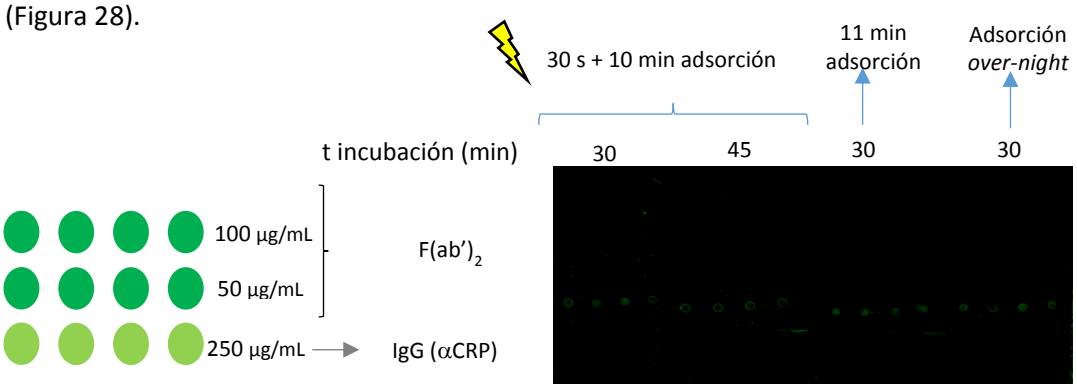

Figura 28: A la izquierda se muestra el esquema del *microarray* empleado, se imprimieron 4 *microarrays* de 3×4 a distintas concentraciones de $F(ab')_2$ e IgG. Cada chip fue tratado de manera distinta variando tanto el tiempo de incubación y el tiempo de irradiación o de adsorción. Se observa como únicamente el anticuerpo es capaz de reconocer al biomarcador.

Dados los resultados, se vio que el $F(ab')_2$ no era capaz de reconocer al biomarcador. Se realizaron más experimentos siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante.

En un primer lugar, se pensó que la causa de que no reconociera era que el fragmento no estaba lo suficientemente puro o que el tampón no era el adecuado para que se produjera la unión con la superficie. Para tratar de resolver estos problemas se intentó concentrar los fragmentos y a

cambiar el tampón empleando PBS 1×. Se emplearon filtros de 50K, 30K y 3K de distintas casas comerciales (ThermoFisher y Millipore) pero el resultado fue que la masa se perdía en el filtro. Este resultado anómalo nos hizo pensar que los fragmentos contenían algún tipo de sustancia en el tampón que provocaba que se desestabilizaran las membranas de los filtros.

También se observó que los puntos una vez impresos en los chips no se secaban con rapidez como ocurría en el caso del modelo policlonal. Este hecho nos hizo pensar que el kit, en algunos de sus tampones, debía de llevar alguna sustancia como pueden ser el glicerol o DMSO que impedía que se secaran las gotas en los chips, y que además, fuera capaz de desestabilizar las membranas de los filtros. Para comprobar cuál de estos tampones era el que contenía esta sustancia que no se secaba se puso una gota de cada uno de los tampones en un chip para ver si dichas gotas eran capaces de secarse. En el experimento llevado a cabo se concluyó que los tampones que no se secaban eran el *Binding Buffer* y la suspensión de ficina.

La ficina no se podía cambiar por otra sustancia ya que es la enzima necesaria para obtener los fragmentos, pero el *Binding Buffer* fue reemplazado por PBS 1×. Los resultados de la digestión realizando estos cambios en el protocolo del fabricante se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados de la digestión de αCRP tras someter al producto de la digestión a una cromatografía de afinidad (columna de proteína A). Rendimiento de la cromatografía de afinidad y rendimiento total de proceso de digestión. $F(ab')_2$: Distintas fracciones recogidas en la columna de proteína A. IgG: Distintas fracciones de anticuerpo recogidas tras romper la interacción con la columna.

Muestra	Volumen (µL)	Cantidad de proteína (µg/mL)	RENDIMIENTO	RENDIMIENTO TOTAL
$F(ab')_2$ 1	100	105	95%	95%
$F(ab')_2$ 2	169	43		
$F(ab')_2$ 3	125	23		
$F(ab')_2$ 4	196	10		
IgG 1	-	0	0%	
IgG 2	-	0		
IgG 3	-	0		

Una vez obtenidos los fragmentos en este tampón fueron probados a ver si de esta manera eran capaces de reconocer a la CRP marcada. Se observó que aunque se hubiese cambiado el *Binding Buffer* por el PBS 1× las gotas que contenían en $F(ab')_2$ tardaban en secarse a diferencia de lo que ocurría con el IgG αCRP. El hecho de que las gotas estuvieran secas resultaba primordial para que la fotoinmovilización pudiera tener éxito, por ello, se esperó a que las gotas estuvieran casi secas (no se secaban por completo). En el tiempo en que las gotas tardaban en secarse, los chips se mantuvieron a temperatura ambiente. Una vez secas, se irradiaron los chips 30 segundos en el ozonizador y, a continuación, se procedió a lavar los chips. Este cambio del protocolo se siguió siempre que se daba el caso de que las gotas no se secaran.

3.2 Optimización del tiempo de irradiación

Se realizaron experimentos similares a los realizados con el sistema BSA/αBSA para ver si de la misma manera que ocurría en dicho modelo, el $F(ab')_2$ era capaz de reconocer al biomarcador con una mayor sensibilidad que el anticuerpo completo. En estas primeras aproximaciones, únicamente se trató de determinar el tiempo de irradiación que ofrecía los mejores resultados (Figura 29):

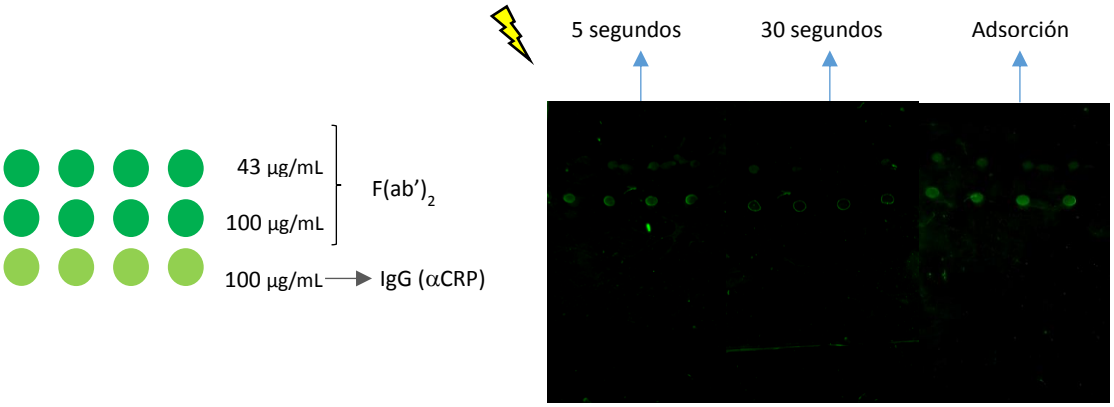

Figura 29: A la izquierda de la figura se puede observar el esquema del experimento se generaron 3 *microarrays* de 3×4 los cuales se imprimieron $F(ab')_2$ e IgG a distintas concentraciones y se irradiaron a distintos tiempos.

En dicho experimento se observa que el anticuerpo completo da una mayor intensidad de fluorescencia que el fragmento $F(ab')_2$. Este hecho se justificó debido al largo periodo de tiempo que los chips se habían mantenido sin tratar favoreciendo la adsorción. Para corroborar dicha hipótesis los chips se lavaron exhaustivamente tras la inmovilización con PBS-T, si ésta se cumplía, el anticuerpo completo debería dar cada vez menos intensidad de fluorescencia dado que las uniones son uniones débiles, y los fragmentos $F(ab')_2$ en los chips irradiados deberían de mantener constante la fluorescencia o bajar un poco ya que se trataría de uniones covalentes y orientadas (Figura 30).

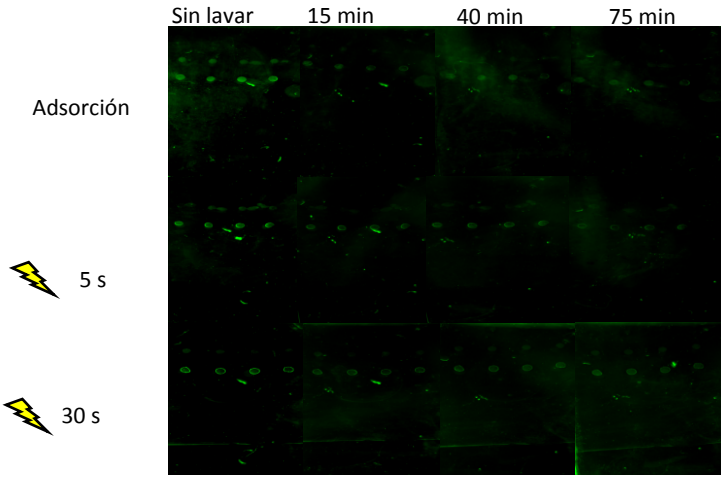

Figura 30: Imágenes de los chips del experimento anterior irradiados a distintos tiempos tras ser lavados con PBS-T también durante distintos tiempos.

A continuación, se probó a realizar el mismo ensayo, pero intentando minimizar el tiempo necesario para que las gotas se secaran y, una vez irradiados los chips, se procedió a hacer un lavado en PBS-T de 15 minutos en agitación, más largo que el que está reflejado en la sección de materiales y métodos. También se probó a bajar la concentración de CRP* con la que se incuban los chips, en los experimentos anteriores se había incubado a 10 µg/mL, pero en esta ocasión se incubó con CRP* a 5 µg/mL (Figura 31).

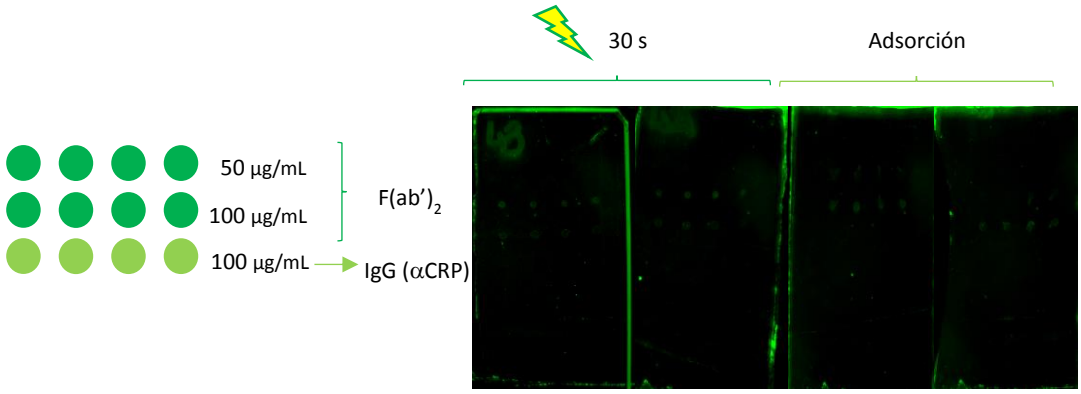

Figura 31: A la izquierda se observa el esquema del experimento y a la derecha se observa el resultado del experimento. Se sigue observando que tras el lavado exhaustivo el anticuerpo da una mayor fluorescencia que el $F(ab')_2$ tras incubar con CRP*. Estos resultados se le atribuyeron a la presencia de glicerol residual que impedía el secado de las gotas tras la impresión.

Los resultados obtenidos fueron similares a los que se daban en el caso del modelo policlonal (BSA/αBSA). En la Figura 32 se observa cómo el fragmento $F(ab')_2$ da una mayor intensidad de fluorescencia que el anticuerpo completo. También podemos observar que en el caso de los chips que únicamente estuvieron adsorbiendo los puntos tienen una intensidad de fluorescencia más baja y están más distorsionados, incluso se puede observar cómo el anticuerpo completo da una mayor intensidad de fluorescencia que el fragmento $F(ab')_2$. De los resultados podríamos concluir que al irradiar los puentes disulfuro de la región bisagra son más accesibles en el caso del fragmento $F(ab')_2$ que en el caso del anticuerpo completo, por lo que al irradiar estos puentes disulfuro podrían romperse permitiendo que se produjera la reacción del tiol-eno entre la superficie y el fragmento.

3.3 Ensayo de especificidad

Por último, para comprobar la especificidad del modelo monoclonal, se hizo un experimento en el cual se imprimieron en el chip fragmentos $F(ab')_2$ como anticuerpos completos αCRP y se incubaron con BSA marcada a una concentración de 10 µg/mL (Figura 32).

Figura 32: Resultado de incubar un chip con fragmentos de αCRP y con αCRP e incubar con BSA*.

A la vista de los resultados de este experimento, se concluyó que el modelo monoclonal CRP/αCRP es específico para su biomarcador.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha puesto a punto un método de inmovilización de anticuerpos sobre superficies de vidrio funcionalizadas. La inmovilización se produce inducida por luz y emplea los tioles del receptor para unirse a los dobles enlaces de la superficie mediante la reacción de acoplamiento tiol-eno.

Se ha demostrado la capacidad que tienen los fragmentos obtenidos de los anticuerpos para unirse a la superficie y detectar a su antígeno. También se ha llevado a cabo la optimización de todos los parámetros involucrados en la fabricación de un *microarray* de proteínas.

Más concretamente, en el caso del modelo policlonal, se ha demostrado cómo el fragmento $F(ab')_2$ es capaz de unirse a la superficie y reconocer a la proteína marcada de una manera más eficaz que el anticuerpo completo. Este hecho junto con la irradiación hacen que la unión fragmento de anticuerpo-superficie tenga lugar a través de un enlace más robusto como es el enlace covalente. Estos hechos se podrían explicar dado que al hacer la digestión, dicho fragmento tiene grupos tioles libres o de más fácil acceso para facilitar su unión a la superficie cuando son irradiados.

En el modelo monoclonal, se han obtenido resultados muy similares siguiendo el mismo procedimiento. En dicho modelo faltan parámetros por optimizar para alcanzar las prestaciones obtenidas para el sistema BSA/αBSA, no obstante la información aportada por el modelo policlonal, facilitará el trabajo de optimización restante para el modelo monoclonal.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Angenendt, P. (2005). Progress in protein and antibody microarray technology.*Drug discovery today*, *10*(7), 503-511.

Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., & MacKenzie, R. (2005). Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer and Metastasis Reviews*, *24*(4), 501-519.

Chamritski, I., Clarkson, M., Franklin, J., & Li, S. W. (2007). Real-time detection of antigen–antibody reactions by imaging ellipsometry. *Australian Journal of Chemistry*, *60*(9), 667-671.

Chen, G., Ito, Y., & Imanishi, Y. (1997). Photo-immobilization of epidermal growth factor enhances its mitogenic effect by artificial juxtacrine signaling.*Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1358*(2), 200-208.

Chou, C. C., Chen, C. H., Lee, T. T., & Peck, K. (2004). Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. *Nucleic acids research*, *32*(12), e99-e99.

de Wildt, R. M., Mundy, C. R., Gorick, B. D., & Tomlinson, I. M. (2000). Antibody arrays for high-throughput screening of antibody–antigen interactions.*Nature biotechnology*, *18*(9), 989-994.

Escorihuela, J., Bañuls, M. J., Grijalvo, S., Eritja, R., Puchades, R., & Maquieira, A. (2014). Direct Covalent Attachment of DNA Microarrays by Rapid Thiol–Ene "Click" Chemistry. *Bioconjugate chemistry*, *25*(3), 618-627.

Escorihuela, J., Bañuls, M. J., Puchades, R., & Maquieira, Á. (2014). Site-specific immobilization of DNA on silicon surfaces by using the thiol–yne reaction. *Journal of Materials Chemistry B*, *2*(48), 8510-8517.

Escorihuela, J., Bañuls, M. J., Puchades, R., & Maquieira, Á. (2012). DNA microarrays on silicon surfaces through thiol-ene chemistry. *Chemical Communications*, *48*(15), 2116-2118.

Fairbanks, B. D., Sims, E. A., Anseth, K. S., & Bowman, C. N. (2010). Reaction Rates and Mechanisms for Radical, Photoinitated Addition of Thiols to Alkynes, and Implications for Thiol− Yne Photopolymerizations and Click Reactions. *Macromolecules*, *43*(9), 4113-4119.

Hoyle, C. E., & Bowman, C. N. (2010). Thiol–ene click chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, *49*(9), 1540-1573.

Ito, Y. (2006). Photoimmobilization for microarrays. *Biotechnology progress*,*22*(4), 924-932.

Jonkheijm, P., Weinrich, D., Köhn, M., Engelkamp, H., Christianen, P., Kuhlmann, J., ... & Breinbauer, R. (2008). Photochemical Surface Patterning by the Thiol-Ene Reaction. *Angewandte Chemie*, *120*(23), 4493-4496.

Kolb, H. C., Finn, M. G., & Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, *40*(11), 2004-2021.

LaBaer, J., & Ramachandran, N. (2005). Protein microarrays as tools for functional proteomics. *Current opinion in chemical biology*, *9*(1), 14-19.

Liddell, J. M. (2009). Production strategies for antibody fragment therapeutics.*Biopharm international*, 36-42.

Lowe, A. B., Hoyle, C. E., & Bowman, C. N. (2010). Thiol-yne click chemistry: A powerful and versatile methodology for materials synthesis. *Journal of Materials Chemistry*, *20*(23), 4745-4750.

Masri, M. S., & Friedman, M. (1988). Protein reactions with methyl and ethyl vinyl sulfones. *Journal of protein chemistry*, *7*(1), 49-54.

Mizutani, M., Arnold, S. C., & Matsuda, T. (2002). Liquid, phenylazide-end-capped copolymers of ε-caprolactone and trimethylene carbonate: Preparation, photocuring characteristics, and surface layering. *Biomacromolecules*, *3*(4), 668-675.

Park, H. Y., Kloxin, C. J., Scott, T. F., & Bowman, C. N. (2010). Covalent adaptable networks as dental restorative resins: Stress relaxation by addition–fragmentation chain transfer in allyl sulfide-containing resins. *dental materials*,*26*(10), 1010-1016.

Parracino, A., Neves-Petersen, M. T., Di Gennaro, A. K., Pettersson, K., Lövgren, T., & Petersen, S. B. (2010). Arraying prostate specific antigen PSA and Fab anti-PSA using light-assisted molecular immobilization technology.*Protein Science*, *19*(9), 1751-1759.

Rizzi, S. C., & Hubbell, J. A. (2005). Recombinant protein-co-PEG networks as cell-adhesive and proteolytically degradable hydrogel matrixes. Part I: Development and physicochemical characteristics. Biomacromolecules, *6*(3), 1226-1238.

Rusmini, F., Zhong, Z., & Feijen, J. (2007). Protein immobilization strategies for protein biochips. Biomacromolecules, *8*(6), 1775-1789.

Schena, M., Heller, R. A., Theriault, T. P., Konrad, K., Lachenmeier, E., & Davis, R. W. (1998). Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends in biotechnology*, *16*(7), 301-306.

Sobek, J., & Schlapbach, R. (2004). Substrate architecture and functionality: defining the properties and performance of DNA, peptide, protein and carbohydrate microarrays. *PharmaGenomics*, *4*(7), S32-S32.

Sugawara, T., & Matsuda, T. (1995). Photochemical protein fixation on polymer surfaces via derivatized phenyl azido group. *Langmuir*, *11*(6), 2272-2276.

Weinrich, D., Köhn, M., Jonkheijm, P., Westerlind, U., Dehmelt, L., Engelkamp, H., ... & Schröder, H. Waldmann (2010). Preparation of Biomolecule Microstructures and Microarrays by Thiol–ene Photoimmobilization. *ChemBioChem*, *11*(2), 235-247.

Zhu, H., & Snyder, M. (2003). Protein chip technology. *Current opinion in chemical biology*, *7*(1), 55-63.

Zhu, H., & Snyder, M. (2001). Protein arrays and microarrays. *Current opinion in chemical biology*, *5*(1), 40-45.