

VALIDACIÓN DE UN ELISA SANDWICH Y APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS PARA EL MONITOREO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA SPIKE DE SARS-CoV-2

Mendoza, Kimey¹

¹UNL, FBCB, Centro Biotecnológico del Litoral (CBL), Santa Fe, Pcia. Santa Fe S3000ZAA, Argentina.

Director/a: Rodríguez, María Celeste

Codirector/a: Villaraza, Javier

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Validación, ELISA, Proceso de Producción

INTRODUCCIÓN

A fines de diciembre de 2019, un nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) fue identificado como el agente etiológico de la enfermedad respiratoria COVID-19. El virus se propagó rápidamente en todo el mundo y, en 2020 la Organización Mundial de la Salud (WHO, de sus siglas en inglés, *World Health Organization*) declaró la enfermedad una pandemia. Hasta la fecha, dicha enfermedad ha provocado más de 7,1 millones de muertes (WHO, julio 2024). La apariencia que tiene la partícula vírica o virión de SARS-CoV-2 es la de una corona solar. La estructura del virión consiste principalmente en una nucleocápside (que protege al material genético viral) y en una envoltura externa. En esta última, se encuentra insertada la proteína estructural spike (S), que facilita la unión del virus al receptor de la célula huésped. Dado que la glicoproteína S se encuentra expuesta en la superficie del virus, representa el principal candidato antigénico para el desarrollo de vacunas contra el SARS-CoV-2. En este contexto, en el Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico (LDB-FBCB-UNL) se planteó el desarrollo del proceso de producción de la proteína S de SARS-CoV-2 en cultivos de células HEK293 para el diseño racional de antígenos vacunales como estrategia de inmunización.

En este trabajo, en primer lugar, se propuso la validación de un método univariado ELISA tipo sándwich (sELISA) para el monitoreo de parámetros críticos de cultivos (CPPs, de sus siglas en inglés), como los niveles de concentración de la proteína recombinante S en cultivos celulares. La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio, que un método es apropiado para el uso propuesto. Los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas

Título del proyecto: Producción de ectodominios de la proteína spike de variantes de preocupación de SARS-CoV-2 y diseño racional de antígenos vacunales como estrategia de inmunización.

Instrumento: PICTO-COVID-INMUNIZACION-0003

Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el desarrollo Tecnológico y la Innovación (AGENCIA I+D+i) y el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT)

Director/a: Prieto, Claudio



(ELISA) son uno de los métodos más utilizados para la detección y cuantificación rutinaria de biomarcadores en muestras complejas. Se caracterizan por su alta selectividad, sensibilidad y versatilidad.

Por otro lado, se propuso emplear métodos que combinan datos espectrales (MEE, matrices de fluorescencia excitación-emisión) con modelos quimiométricos multivariados de orden superior como el método de resolución multivariada de curvas mediante mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS, de sus siglas en inglés) para desarrollar un modelo predictivo que permita el monitoreo de cultivos con un menor tiempo y costos asociados. La quimiometría es una rama de la química analítica que permite la optimización y la extracción de datos cualitativos y cuantitativos significativos de sistemas complejos, mediante la utilización de modelos matemáticos y estadísticos. Según la dimensión de los datos de entrada se clasifican en, modelos de primer orden y de orden superior (HOM, por sus siglas en inglés). Los HOM, como aquellos basados en MEE, poseen ventajas denominadas de segundo orden debido a la descomposición tridimensional de la matriz de datos. Dentro de los métodos espectrofotométricos, la fluorescencia es una técnica analítica simple, rápida, de bajo costo, no destructiva de la muestra, sensible y selectiva (Vignaduzzo et al., 2020).

OBJETIVOS

- Validar un método de sELISA como método de referencia para el monitoreo de CPPs, tales como la evolución de la proteína S en diferentes sistemas de cultivos celulares.
- Obtener información cualitativa de parámetros críticos del cultivo a partir de MEE de fluorescencia y datos multivariados, que permitan inferir en el estado metabólico del cultivo de células HEK293 productoras de la proteína S.

METODOLOGÍA

Para los ensayos de sELISA se recubrieron microplacas de 96 pocillos (Greiner) con un anticuerpo de captura anti-S y se incubó a 37 °C durante 1 h y luego a 4 °C durante la noche. Se realizó un paso de bloqueo con una solución de leche descremada 2% (p/v) en *buffer* fosfato salino (PBS, de sus siglas en inglés) conteniendo Tween 20 0,05 % (v/v) (PBS-T) para evitar uniones inespecíficas. Seguido de un paso de incubación de las muestras y un estándar interno (proteína S, 95% pureza) por 1 h a 37°C. Luego, se realizó un paso de incubación con anticuerpos anti-S biotinilados a 37 °C. A continuación, se añadió un conjugado de Estreptavidina-Peroxidasa (Sigma) y se incubó a 37°C por 1 h. Finalmente, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas tras la adición de sustrato y formación de color. Después de cada incubación, se realizaron lavados con una solución de leche descremada 0,2% (p/v) en PBS-T. Para la validación del sELISA, se evaluaron las siguientes cifras de mérito: sensibilidad (SEN), sensibilidad analítica (γ), límite de detección y cuantificación (LOD y LOQ, respectivamente), linealidad, precisión y exactitud (selectividad), según la Guía ICH Q2(R1) (ICH, 2005). La evaluación de la exactitud se llevó a cabo mediante la aplicación de una prueba de región de confianza conjunta elíptica (EJCR) mediante regresión de mínimos cuadrados bilineal (BLS) y un test de no-parallelismo. Las cifras de mérito se calcularon mediante un código interno que opera en el entorno Python. El test EJCR y la regresión mediante BLS se realizaron empleando una rutina libre *univar_ejcr* que opera en el entorno de MATLAB®.

Los datos espectrales se adquirieron con un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-55. Posteriormente, se realizó el preprocesamiento de cada matriz de manera tal de eliminar las interferencias espectrales,

para lo cual se empleó una interfaz gráfica que opera en el entorno MATLAB® ('EEM-corr', Chiappini et al., 2019). Por último, cada bioproceso, se analizó en forma independiente mediante el método extendido de MCR-ALS (Tauler, 1995, Jaumot et al., 2015), permitiendo la resolución de los perfiles de concentración (**C**) y los espectros puros (**S^T**) de diferentes especies en una matriz aumentada por columnas (muestra diaria de cada sistema de bioproceso).

Se analizaron muestras de tres cultivos independientes. Dos de ellos, realizados en biorreactor operando en modo perfusión (BioR-1 y BioR-2) con una duración total de cinco ($n = 5$ muestras) y nueve días ($n = 10$ muestras), respectivamente, y un tercer cultivo, realizado en modo *batch* en matraces Erlenmeyer de 0,5 L en incubadora gaseada con agitación y temperatura controlada, durante 8 días. Asimismo, se cultivaron células HEK293 no recombinantes en modo *batch*, con una duración total de 5 días. El sobrenadante del último cultivo se utilizó como matriz de muestra.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluó la capacidad predictiva del inmunoensayo sELISA. Para obtener una distribución normal de los datos, se aplicó una transformación logarítmica a la concentración de S ($\mu\text{g/mL}$). Así, las curvas dosis-respuesta se modelaron mediante una regresión lineal, que, según el principio de parsimonia, simplifica el análisis posterior. Luego, se determinó el promedio y desvío estándar de las cifras de mérito obtenidas a partir de tres ensayos independientes: SEN ($1,4 \pm 0,2 \text{ Abs} \cdot \text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$), γ ($30 \pm 10 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$), LOD ($0,15 \pm 0,04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), LOQ ($0,5 \pm 0,1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). La precisión se determinó a dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia. El estándar interno se evaluó en tres niveles diferentes dentro del rango lineal (dosis baja, media y alta) ($n=3$ para cada nivel) en tres ensayos independientes y se analizó mediante coeficiente de variación inter e intra (CV%) ensayo. Los CV% obtenidos para los diferentes niveles (alto, medio y bajo) fueron; 18,38%, 18,62% y 12,42%, respectivamente. Respecto a la exactitud, este parámetro se evaluó comparando la respuesta del estándar interno a 3 niveles de concentración (alto, medio y bajo) ($n=3$) con la respuesta obtenida de dicho estándar fortificado en diferentes diluciones (1:2, 1:4, 1:8 y 1:12) de matriz (sobrenadante de cultivos condicionado por células HEK293 no recombinantes). Se aplicó un método de regresión BLS y la prueba EJCR. En todos los casos, los resultados obtenidos se consideran exactos ya que el punto ideal (pendiente = 1, intersección = 0) se incluye en cada elipse. Asimismo, se realizó una prueba de no paralelismo para confirmar que la relación dosis-respuesta del ensayo es selectiva para el analito de interés y no está influenciada por otros componentes presentes en la matriz de la muestra que puedan generar errores sistemáticos proporcionales. Se evaluó la curva dosis-respuesta del estándar puro y del estándar embebido en matriz diluida 1:2, 1:4 y 1:8. Las pendientes de las 3 curvas resultantes se compararon con la pendiente de la curva estándar, mediante el test de t de Student. Todas las curvas fueron consideradas paralelas, ya que sus pendientes no mostraron diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza del 95%).

En relación a los cultivos celulares, se monitoreó el crecimiento celular mediante conteo de células (cel.mL^{-1}) y viabilidad (%), además, se siguió la evolución de la concentración de la proteína S. Para el cultivo en modo *batch*, la concentración celular máxima alcanzada fue $5 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, con viabilidades superiores a 80% y una concentración de proteína máxima de $1,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$. En el BioR-1, la máxima densidad celular alcanzada fue aproximadamente de $13 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$, con viabilidades mayores a 85%, y la concentración máxima de proteína S fue de $1,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Por último, el BioR-2 obtuvo la mayor concentración celular de $1,4 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ con una viabilidad superior a 65%, y la concentración de proteína S de $2,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Posteriormente, se combinaron MEEs de las muestras diarias de cultivo y análisis mediante MCR-ALS para obtener la información espectral de los principales componentes de los cultivos y determinar su contribución relativa durante la evolución del bioproceso. Se identificaron dos componentes (>97% de varianza acumulada, $S_{fit} < 10,5$ residuos del análisis de PCA) después del modelado mediante MCR-ALS. Posteriormente, se obtuvo el perfil de excitación (modo no aumentado **S^T**) y el perfil de emisión de ambas especies (modo **C** aumentado) a partir del cual se estimó la contribución relativa de ambas especies en cada submatriz. Si bien no se realizó una confirmación experimental para identificar cada componente presente en el sistema, según lo reportado en la literatura (Chiappini et al., 2021, Lakowicz JR., 2006, Cannon et al., 2021), al comparar los máximos de $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ y la forma de los espectros de cada componente, se puede inferir la identidad de ambos analitos. La posición espectral del componente 1 para todos los sistemas de cultivo, con máximos de $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ a 290 nm/368 nm, se corresponde con el aminoácido triptófano como constituyente de la proteína S. Los máximos de $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ a 375 nm/470 nm del componente 2, se pueden corresponder a coenzimas, como por ejemplo NADH, relacionadas con el estado metabólico del cultivo. A partir de los espectros de emisión, se estimó la contribución relativa de cada componente, y se graficó en función de los días de cultivo. Se observó, en todos los sistemas de cultivo que a medida que evolucionó el bioproceso, se logró una mayor señal para el componente 2, lo que podría correlacionarse con el metabolismo celular. Sin embargo, para el componente 1, contrariamente a lo esperado, se obtuvo una correlación negativa entre la señal y la abundancia del mismo, el cual se atribuye a la proteína S, y se esperaría que al pasar los días de cultivo éste aumente. Este tipo de comportamiento se podría atribuir al efecto filtro interno, *quenching* y transferencia de energía, debido a que se trata de muestras biológicas complejas.

En resumen, se logró realizar la validación del método de referencia sELISA, obteniendo resultados aceptables para los parámetros analíticos y las cifras de mérito estimadas. Este resultado permitió obtener un método de referencia que permite valorar parámetros críticos de cultivo como la evolución de la proteína S a lo largo del bioproceso. Por otro lado, combinando datos espectrales con métodos quimiométricos fue posible realizar una identificación preliminar de fluoróforos químicamente significativos presentes en muestras de cultivos celulares, como la cantidad de proteína S (componente uno) y parámetros del metabolismo celular como coenzimas (p. ej., NADH, componente dos), por lo que constituye una herramienta útil para el seguimiento del bioproceso y monitoreo de parámetros críticos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Cannon TM, Lagarto JL, Dyer BT, Garcia E, Kelly DJ, Peters NS, Lyon AR, French PMW, Dunsby C, 2021. Characterization of NADH fluorescence properties under one-photon excitation with respect to temperature, pH, and binding to lactate dehydrogenase, *OSA Contin*, 4, 1610.
- Chiappini, FA; Azcarate, S; Alcaraz, MR; Forno, ÁG; Goicoechea, HC. 2021. Prospective inference of bioprocess cell viability through chemometric modeling of fluorescence multiway data. *Biotechnol Progress*, 37(4): e3173.
- Chiappini, F; Alcaraz, MR; Goicoechea, HC. 2019. An improved signal-conservative approach to cope with Rayleigh and Raman signals in fluorescence landscapes, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 187, 6-10.
- ICH (2005) Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2(R1). Published online 2005:1-13.
- Jaumot, J; de Juan, A; Tauler, R. 2015. MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 140, 1-12
- Lakowicz JR, 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer US.
- Tauler, R; Smilde, A; Kowalski, J. 1995. Multivariate curve resolution applied to second order data, *Chemom*, 9, 31-58.
- Vignaduzzo, S; Maggio, R y Olivieri, CA. 2020. Why should the pharmaceutical industry claim for the implementation of second-order chemometric models—A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 179, 112965.
- WHO COVID-19 Dashboard. Extraído en: 7/7/2024 de <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c>.