

Màster Universitari Ciència i Tecnologia Químiques

Iniciació a la Recerca i Treball Fi de Màster

**ESTRATÈGIES D'IMMOBILITZACIÓ ORIENTADA
D'ANTICOSSOS PER A LA DETECCIÓ DIRECTA EN
BIOSENSORS ÒPTICS: INFLUÈNCIA EN LA
SENSIBILITAT I ESPECIFICITAT**

Maria Soler Aznar

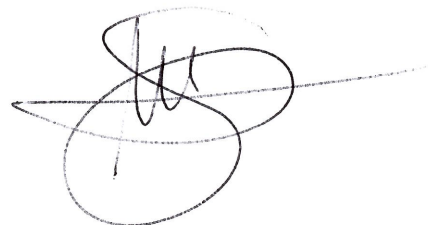
Directora: **M.Carmen Estévez**
Centre d'Investigació en Nanociència i Nanotecnologia (CIN2-CSIC)

Tutor: **Esteve Fàbregas**
Departament de Química, Facultat de Ciències i Biociències, UAB

Setembre 2012

Memòria presentada per superar el mòdul d'Iniciació a la Recerca i Treball Fi de Màster corresponent al Màster Universitari Ciència i Tecnologia Químiques.

Maria Soler Aznar

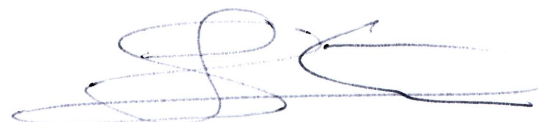
A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Vist i plau,

M. Carmen Estévez
(Directora)

A handwritten signature in black ink, featuring a series of loops and a long horizontal stroke at the bottom.

Esteve Fàbregas
(Tutor)

A handwritten signature in black ink, with a complex, multi-looped structure and a long horizontal stroke extending to the right.

Resum

Els assajos de diagnòstic clínic i biomèdic requereixen tècniques de detecció sensibles, selectives i ràpides que permeten mesurar concentracions de substàncies directament de mostres biològiques com sang, orina o sèrum. Els dispositius biosensors compleixen en gran mesura aquests requisits i en particular, molts esforços van dirigits actualment al disseny de versions compactes de mida reduïda tipus "point of care" (POC) que permeten, per exemple, deslocalitzar les anàlisis dels hospitals i que proporcionen un seguiment del pacient més proper i eficient. Tot i així, la transferència d'aquestes tecnologies a dispositius miniaturitzats i portàtils amb aplicacions definides encara no està totalment assolida. Apart de les dificultats inherents a la integració de components electrònics, òptics, de distribució de líquids, etc. en un sistema menut i portàtil, un important repte en la miniaturització de biosensors és la biofuncionalització de la superfície sensora i la seua estabilitat una vegada s'han immobilitzat els reactius biològics. La detecció de biomarcadors proteics es duu a terme principalment mitjançant immunoassajos, basats en el reconeixement específic de la proteïna per part d'anticossos específics. En el cas de biosensors, el format directe, en el qual un anticòs s'immobilitza sobre la superfície sensora i la proteïna diana es detecta directament de la mostra, hauria de ser el format preferible. Tanmateix, és un dels menys eficients en termes d'estabilitat i sensibilitat, degut en part a la necessitat d'immobilitzar l'anticòs en una orientació adequada sense perjudicar l'afinitat per la molècula diana. En aquest treball s'ha fet un estudi comparatiu entre diferents metodologies d'immobilització d'anticossos sobre un transductor òptic i s'han desenvolupat i optimitzat diferents estratègies de bloqueig de superfície a fi d'obtenir un procediment robust, estable, aplicable a superfícies sensores de diferent naturalesa i que a més, permeta la detecció sensible i selectiva en mostres complexes.

Introducció	3
Objectius	11
Resultats i Discussió	11
1. Consideracions prèvies	11
2. Optimització de les estratègies d'immobilització	13
1.1 Estratègia Covalent.....	14
1.2 Estratègia Proteïna G	18
1.3 Estratègia Prolinker	24
3. Comparació de les estratègies amb altres sistemes d'interès biològic.....	29
4. Prevenció i minimització d'adsorcions inespecífiques.....	32
Conclusions.....	36
Part Experimental.....	37
1. Purificació de l'anticòs anti-hCG	37
2. Estratègies d'immobilització de l'anticòs.....	38
Bibliografia.....	41

Introducció

Durant els darrers anys, l'espectacular avenç de la nanociència i la nanotecnologia ha posat de manifest importants reptes en el camp de la biomedicina, sobretot en referència al diagnòstic clínic i la teràpia. El control de les propietats úniques dels materials a escala nanomètrica fa possible la posada en marxa de noves pautes terapèutiques més selectives i eficaces, al mateix temps que s'han desenvolupat noves metodologies de diagnòstic que permeten la detecció més primerenca i fiable.

Entre els actuals mètodes disponibles per a la detecció, els biosensors han esdevingut ferramentes clau ja que proporcionen anàlisis ràpides amb una excel·lent sensibilitat i reproductibilitat i permeten dur a terme assajos a nivell bioquímic i cel·lular^[1]. En aquest sentit, la recerca en el camp de biosensors i la nanotecnologia ha obert les portes a la creació de dispositius "point-of-care" (POC)^[2-4], plataformes biosensores integrades i portàtils que permetran una detecció ràpida, sensible i d'una àmplia diversitat d'analits emprant petites mostres del pacient i fent que puguin ser traslladats del laboratori a l'àmbit clínic i ser emprats de forma directa pel personal mèdic o el propi usuari^[5].

Un biosensor es defineix com un dispositiu analític que detecta la interacció entre dues o més biomolècules i la converteix en un senyal processable i quantificable. Els biosensors es componen per un element de reconeixement biològic (per exemple anticossos, receptors, seqüències d'ADN, etc.) que es troba en contacte íntim amb un transductor fisicoquímic. El receptor és capaç d'interaccionar amb un analit específic de manera que la interacció genera un canvi en les propietats del transductor, essent la resposta proporcional a la concentració d'analit (Figura 1).

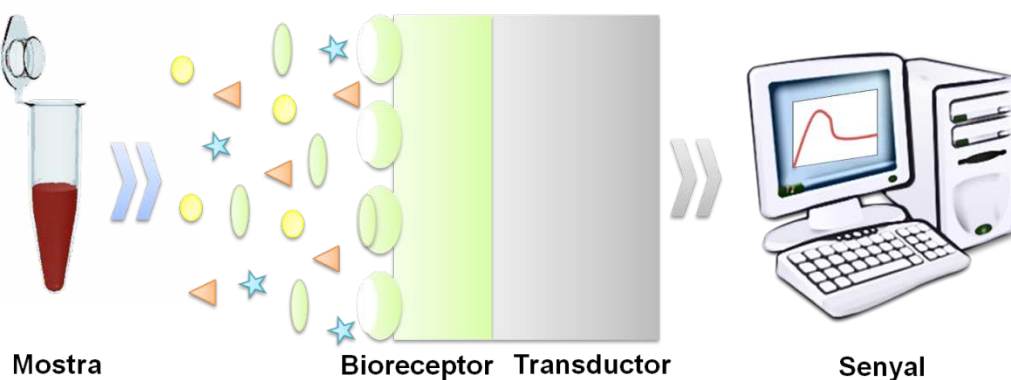


Figura 1.- Esquema d'un biosensor

Els biosensors poden classificar-se en funció del tipus de senyal generat pel transductor. Els més habituals són:

- Electroquímics^[6]; mesuren el canvi produït en un elèctrode químicament modificat com a conseqüència de la interacció entre un element de bioreconeixement i l'analit. Poden ser amperomètrics, potenciomètrics, conductimètrics o impedimètrics.
- Òptics^[7]; es basen en canvis produïts en les característiques de la llum en el transductor que permeten detectar i quantificar una interacció bioquímica entre el receptor i l'analit. Podem trobar-ne, per exemple, basats en canvis d'absorció, de fluorescència o l'índex de refracció.
- Piezoelèctrics^[8]; consisteixen en cristalls que poden oscil·lar a una freqüència específica en aplicar-los un corrent determinat i mesuren canvis en la massa produïts per la unió de l'element de bioreconeixement i l'analit.
- Nanomecànics^[9]; estan formats per micropalanques que es mouen degut a la tensió superficial generada quan té lloc el reconeixement biomolecular.

Entre els distints tipus, els biosensors òptics mostren un gran potencial per al disseny i creació de dispositius POC^[10]. Els transductors òptics presenten avantatges respecte la resta ja que permeten la detecció en temps real i sense ús de marcadors, en general tenen una sensibilitat major i en molts casos ofereixen la possibilitat de multidetecció en paral·lel.

Malgrat la importància del tipus de biosensor, un altre factor clau en el desenvolupament d'una metodologia vàlida de detecció d'una molècula d'interès és sens dubte la qualitat del receptor biològic, i de la correcta immobilització sobre el transductor. Així, és la combinació de dispositius sensors d'elevada sensibilitat i robustesa i d'elements de reconeixement altament específics, com ara els anticossos, el que pot donar lloc a assajos amb propietats tals que permeten la detecció de molècules d'analit a baixes concentracions i amb elevada fiabilitat.

Entre els biosensors òptics, un dels més emprats per la seua robustesa i sensibilitat és el biosensor de ressonància de plasmó superficial (SPR – *surface plasmon resonance*)^[11]. El plasmó superficial són les oscil·lacions harmòniques dels electrons d'una superfície metàl·lica que es generen en fer incidir un feix de llum polaritzada en un determinant angle, anomenat angle de ressonància, a la interfase de dos medis amb constants dielèctriques oposades, com són un metall i un dielèctric. Aquest plasmó superficial crea una ona evanescent que es propaga per la superfície metàl·lica i penetra en el medi adjacent entre 50 i 500 nm, depenent de la longitud d'ona emprada i els materials de la superfície. Aquesta ona, també anomenada camp evanescent, és molt sensible a les condicions de l'entorn, com per exemple l'índex de refracció (IR) del medi en contacte amb la superfície. Així, canvis de massa que es produeixen al seu si i que provoquen canvis en l'IR, com per

exemple els resultants d'interaccions biomoleculares que ocorren a la superfície del transductor, poden ser detectats i quantificats.

Per obtenir ressonància de plasmó superficial s'han de complir certes condicions fonamentals, per exemple, com s'ha dit, que les constants dielèctriques del metall i el medi extern siguin de signe contrari. Aquesta condició només es compleix en metalls com l'or, la plata o l'alumini i a una freqüència en la zona del visible i infraroig.

L'acoblament de la llum per excitar el plasmó superficial en la interfase del metall i el dielèctric es pot dur a terme mitjançant diversos dispositius d'acoblament entre els quals s'inclouen prismes^[12], guies d'ona^[13] i xarxes de difracció^[14]. L'ús de prismes d'acoblament, conegut com la configuració de Kretschmann^[15], és el mètode més utilitzat per a l'excitació del plasmó superficial (Figura 2). En aquesta configuració, un feix de llum travessa un prisma d'elevat índex de refracció i és reflectit generant el plasmó superficial.

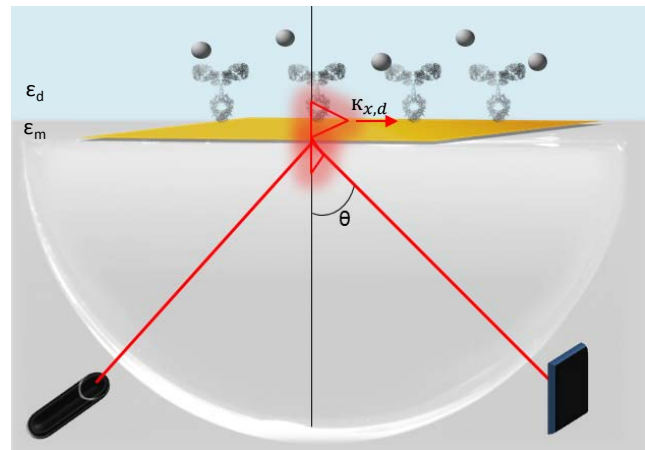


Figura 2.- Esquema d'un biosensor SPR amb configuració de Kretschmann

La majoria de dispositius SPR funcionen amb la configuració de Kretschmann per ser la més simple. Aquesta configuració permet dos modes de detecció (Figura 3), mitjançant la determinació de la variació de l'angle d'acoblament de la ressonància o bé per la variació de la intensitat de la llum reflectida com a conseqüència d'una interacció biomolecular a un angle fix determinat.

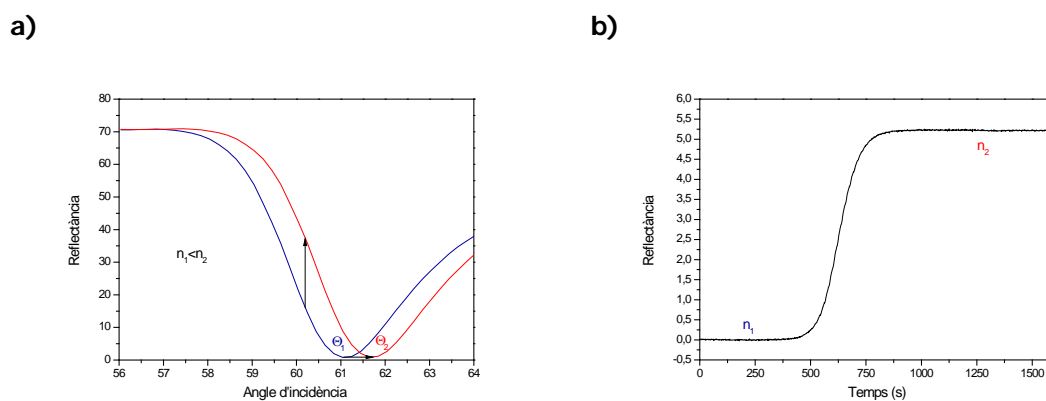


Figura 3.- Resposta del sensor SPR al canvi d'índex de refracció mesurant (a) la intensitat de la llum reflectida en funció de l'angle d'incidència i (b) en funció del temps a un angle d'incidència fix.

La resolució en l'índex de refracció dels sensors SPR amb acoblament per prisma està generalment entre $2 \cdot 10^{-5}$ i $5 \cdot 10^{-5}$ RIU (unitats d'índex de refracció), tot i que alguns dispositius arriben a resolucions de 10^{-7} RIU^[11]. Això significa que el límit de detecció actual dels dispositius SPR està per davall d'1 pg/mm² de material analitzat.

Amb tot, un dels reptes més importants encara en el disseny de biosensors té a veure amb la biofuncionalització de la superfície sensora. Aquesta funcionalització dependrà del tipus d'assaig i la biomolècula a immobilitzar, entre les quals podem trobar proteïnes, com anticossos o enzims, oligonucleòtids o fins i tot sistemes biològics complets com microorganismes, seccions de teixits o cèl·lules. Els anticossos, no obstant, són potser l'element bioreceptor més emprat avui en dia ja que es poden produir per a pràcticament qualsevol tipus d'analít d'interès amb una elevada afinitat i especificitat.

Els anticossos, també anomenats immunoglobulines (Ig), són glicoproteïnes de mida gran (~150 kDa) que poden trobar-se en la sang o altres fluids corporals dels vertebrats, produïts pels limfòcits B del propi organisme com a mecanisme de defensa davant elements estranys (antígens), com ara bacteris, virus o paràsits. Hi ha 5 subclasses, IgA, IgE, IgM, IgD i IgG, essent aquests últims els més abundants i els més habitualment emprats en recerca. L'anticòs està constituït per dues unitats estructurals bàsiques, cadascuna d'elles amb dues cadenes polipeptídiques pesades (50 kDa) i dues cadenes lleugeres (25 kDa). Les quatre cadenes estan unides entre elles per formar una sola biomolècula a través d'enllaços disulfur, prenent una forma Y amb un eix simètric central (Figura 4). Els N-terminals de les cadenes polipeptídiques lleugeres es troben a la part superior de l'estructura en Y, i s'anomenen fragments Fab. Aquests fragments són distintes per a cada tipus d'anticòs i és en aquesta regió on té lloc el reconeixement i interacció específica amb l'antigen amb una afinitat de l'ordre de nM. La seqüència de la cadena pesada, també anomenada Fc, diferencia els anticossos de

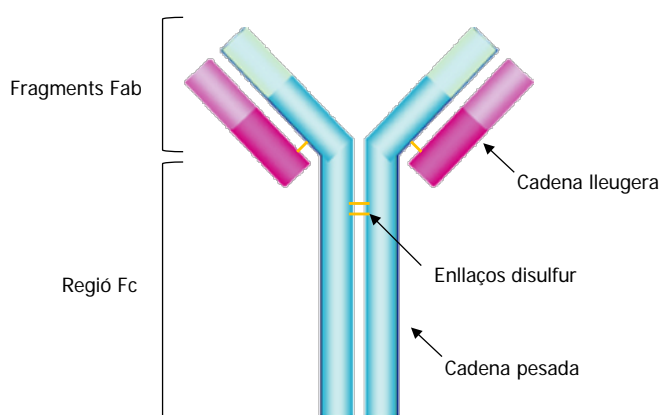


Figura 4.- Estructura bàsica d'un anticòs

les distintes espècies animals i les distintes immunoglobulines (IgG, IgM, IgA, IgD o IgE), però és comuna en totes les subclasses d'immunoglobulines.

Segons el procediment de producció escollit, poden ser de naturalesa policlonal^[16], monoclonal^[17] o recombinant^[18], essent els dos primers els més comunament produïts. Els anticossos policlonals s'extrauen del

sèrum després de la immunització de l'animal hoste i consisteixen en una barreja d'IgG que reconeixen diferents llocs d'unió d'un mateix antigen (diferents epítops de la molècula inoculada). Els anticossos monoclonals, en canvi, són anticossos idèntics que provenen d'una mateixa cèl·lula B i que només reconeixen un únic epítop o lloc d'unió de l'antigen. Un procés adequat de producció pot conduir en general a l'obtenció d'anticossos amb una afinitat força elevada ($K_a \sim nM$).

Aquelles metodologies analítiques que es basen en la detecció d'una molècula per part d'un anticòs específic s'engloben dins el concepte d'immunoassaig. Els basats en fase sòlida, on algun element està immobilitzat sobre un suport, són els més habituals. Dins d'aquests hi ha distints formats de detecció depenent tant de la finalitat de l'assaig com de la mida i pes molecular de les biomolècules (Figura 5):

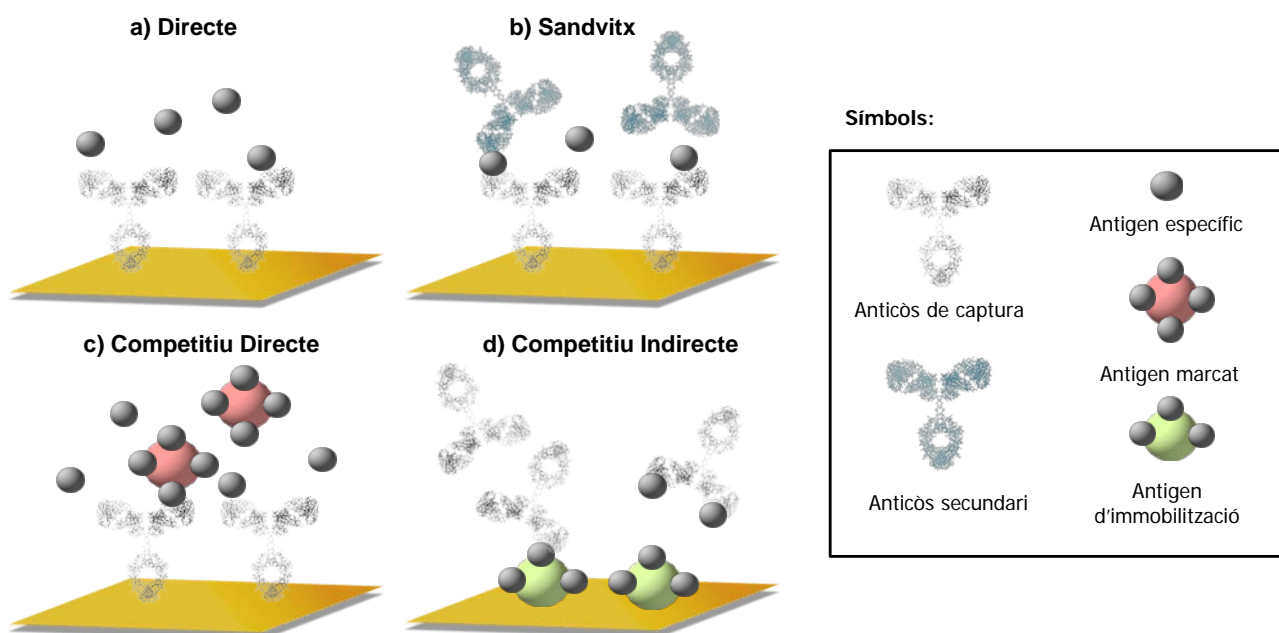


Figura 5.- Principals formats de detecció utilitzats en immunoassajos en fase sòlida. a) Directe: immobilització de l'anticòs i detecció directa de l'antigen; **b) Sandvitx:** immobilització de l'anticòs, detecció de l'antigen i amplificació de la senyal amb anticòs secundari; **c) Competitiu directe:** immobilització de l'anticòs i detecció competitiva de l'antigen marcat en presència de l'antigen; **d) Competitiu indirecte:** immobilització de l'antigen a la superfície i detecció de l'anticòs prèviament incubat amb l'antigen en solució.

Un immunoassaig directe (Figura 5a) en fase sòlida consisteix a detectar l'analit d'interès directament des de la mostra mitjançant l'anticòs específic immobilitzat en la superfície sensora. L'assaig directe és el format preferit en aplicacions en les quals la concentració de l'analit en la mostra produeix una resposta suficient per unió directa a l'anticòs, i segons el tipus de dispositiu això dependrà àmpliament del pes molecular de l'analit (com per exemple en el cas del SPR). La selectivitat i el límit de detecció (LOD) poden ser millorats emprant un format de detecció tipus sandvitx (Figura 5b), en el qual es fa passar un anticòs secundari que interaccionarà amb les

molècules d'analit que s'hagen unit a l'anticòs específic immobilitzat sobre la superfície sensora. Aquest mode de detecció requereix, en general, analits grans que presenten 2 llocs d'unió separats per permetre la interacció amb ambdós anticossos (el de captura i el de detecció). Quan l'analit d'interès no és suficientment gran per detectar-se directament s'opta per formats de detecció competitiu. En el mode competitiu directe (Figura 5c) s'immobilitza sobre la superfície sensora l'anticòs específic però la mostra que conté l'antigen es fa passar juntament amb un analit anàleg marcat o de major pes molecular, de manera que s'estableix una competència entre les dues molècules per unir-se a l'anticòs. En aquest cas, el que es detecta és l'antigen marcat, i per tant el senyal és inversament proporcional a la concentració de l'analit. En el format competitiu indirecte (Figura 5d) una concentració determinada d'anticòs específic s'incuba amb una mostra de concentració desconeguda d'analit. Aquesta dissolució es fa passar per la superfície amb una concentració immobilitzada fixa d'un anàleg a l'antigen. Segons l'analit (gran o petit), es pot immobilitzar directament (quan és gran, com ara proteïnes) o un anàleg prèviament conjugat a una molècula portadora gran (per molècules petites). Els anticossos que no hagen interaccionat amb l'analit de la mostra, s'uniran a l'antigen immobilitzat sobre la superfície sensora i generaran una resposta que serà també inversament proporcional a la concentració d'analit en la mostra.

El format ideal per al desenvolupament de biosensors hauria de ser el directe ja que permet la detecció de l'analit en una sola etapa i sense reactius addicionals. Aquest format permet dur a terme anàlisis directes de mostres reals com sang, sèrum o orina, amb una mínima manipulació de reactius. Esdevé particularment atractiu en el cas de biosensors que detecten canvis de massa, sempre i quan el pes molecular de l'analit siga suficientment alt (~5 kDa). Tot i així, malgrat que hi ha nombrosos exemples on s'han establert metodologies basades en assaigs directes, no sempre acaba sent el mètode escollit. Això és degut principalment a la seua estabilitat i a la necessitat d'una correcta immobilització de l'anticòs, de manera que els fragments Fab queden lliures i disponibles per a la interacció amb l'antigen. Això esdevé un factor més rellevant quan es tracta de desenvolupar assajos en biosensors que operen a temps real i que no requereixen marcadors que amplifiquen el senyal. En aquests casos és desitjable un recobriment de la superfície el màxim d'eficient possible en l'orientació adequada, de manera que les zones de reconeixement queden exposades a la solució i que l'espaiat entre els receptors maximitze la interacció amb l'analit.

Les característiques dels anticossos han donat lloc a molts treballs dirigits a millorar i optimitzar les condicions d'immobilització i s'han desenvolupat diverses estratègies actualment emprades en biotecnologia i en el camp dels biosensors ^[19-20]. En aquest cas, on més s'han vist reflectits aquests estudis és precisament en el dispositiu òptic més àmpliament emprat avui en dia, el biosensor SPR (*Surface Plasmon Resonance*). Aquests estudis estableixen que la immobilització ideal ha de complir

no només el requisit d'una correcta orientació de l'anticòs sinó també bona reproductibilitat en els assajos, la minimització de la manipulació química de les biomolècules i la reducció de l'adsorció inespecífica sobre la superfície.

L'adsorció física dels anticossos sobre un suport sòlid és una de les metodologies d'immobilització més fàcils i més àmpliament emprada. L'adsorció ocorre a través de forces electrostàtiques o hidrofòbiques entre la biomolècula i la superfície sensora; no requereix cap manipulació prèvia dels anticossos i pot emprar-se en diferents suports sòlids^[21]. No obstant, la reproductibilitat sol ser baixa, els anticossos s'adsorbeixen sense orientació definida i poden perdre afinitat per l'antigen per desnaturalització^[22]. Recentment, però, alguns estudis descriuen metodologies d'adsorció d'anticossos sobre superfícies amb una orientació més controlada a través, per exemple, de complexos metàl·lics^[23-24].

Un altre mètode molt comú és la immobilització de l'anticòs per unió covalent a una matriu química prèviament formada sobre la superfície. Aquestes estratègies es basen en la formació de monocapes autoensamblades (SAM – *self-assembled monolayer*)^[25] (Figura 6) funcionalitzades de manera que per activació química, bé de l'anticòs o bé de la monocapa, formen un enllaç covalent entre ambdós. La formació de la SAM proporciona una monocapa uniforme i compacta que redueix l'adsorció de molècules inespecífiques i protegeix les biomolècules del contacte directe amb la superfície, que podria desnaturalitzar-se. A més, permet dur a terme una immobilització senzilla i reproducible i amb una densitat de recobriment controlada. Malgrat que la immobilització química és un procés altament estable, l'enllaç covalent es forma habitualment a través dels grups amina dels residus de lisina (Lys) exposats que estan repartits per tota l'estructura de l'anticòs, i per tant, aquesta metodologia tampoc permet tenir un control de la orientació^[19, 25-26].

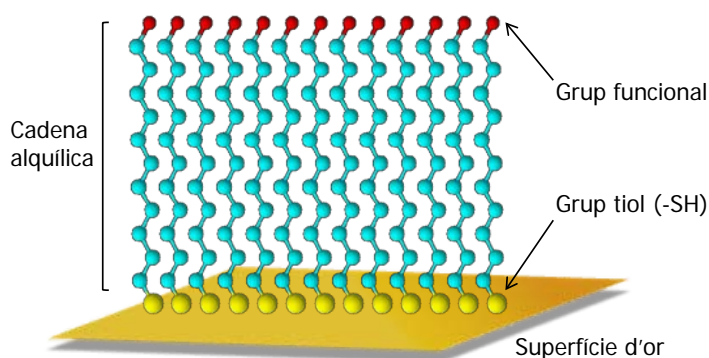


Figura 6.- Representació esquemàtica d'una SAM d'alcanotiol sobre una superfície d'or

D'altra banda s'han desenvolupat també diverses estratègies d'immobilització covalent controlada d'anticossos a través de les cadenes de carbohidrats o dels ponts disulfur^[27-28]. Aquests mètodes permeten, per exemple, immobilitzar directament els fragments Fab, llocs d'unió de l'antigen, a través de grups sulfidril actius^[29-30] que pot resultar en una capacitat d'unió de l'antigen fins a 20 vegades major que en superfícies cobertes amb anticossos intactes^[31]. Tanmateix, requereixen

tractaments químics dels anticossos, tals com l'oxidació de les cadenes de carbohidrats o la reducció dels enllaços disulfur, prèvies a la immobilització que poden influir negativament en l'activitat i afinitat de la biomolècula.

Una altra estratègia àmpliament emprada per a immobilitzar anticossos és a través del sistema biotina/avidina. En aquest cas, es forma un enllaç covalent entre l'anticòs i la biotina que pot ser a través dels grups amina de l'anticòs i resultarà en orientació aleatòria, o bé a través dels grups sulfidril^[31] o les cadenes de carbohidrats^[32]. La biotina conjugada amb l'anticòs interacciona amb molècules d'avidina immobilitzades sobre la superfície amb una afinitat tan elevada ($K_d=10^{-15}M$) que és quasi bé irreversible. Amb aquesta estratègia s'obté un recobriment molt eficient de la superfície biosensora; però té l'inconvenient que requereix manipulació química dels reactius prèvia a la immobilització.

Totes aquestes estratègies (Taula 1) i altres en continu desenvolupament posen de manifest la complexitat i els requeriments necessaris per tal d'obtenir una superfície sensora estable per a la detecció directa. En l'àmbit clínic en particular, i tenint en ment la implementació de dispositius senzills i de baix cost que detecten concentracions baixes de biomarcadors en mostres com sang, orina, sèrum, llet, etc., aquest aspecte resulta clau. En resum, l'estratègia òptima serà aquella que permeti el control de l'orientació de l'anticòs, minimitzant tant la quantitat de reactiu emprada, per tal de reduir costos, com la seua manipulació, per tal de garantir la seua estabilitat i afinitat per l'analit específic.

Taula 1.- Avantatges i desavantatges d'algunes estratègies d'immobilització d'anticossos emprades en biosensors

Mètode d'immobilització	Avantatges	Desavantatges
Adsorció física	<ul style="list-style-type: none"> - Mètode simple - No modificació de l'anticòs - Alta densitat de recobriment 	<ul style="list-style-type: none"> - Orientació aleatòria - Possible desnaturalització de l'anticòs - Adsorció inespecífica de proteïnes - Baixa reproductibilitat
Enllaç covalent genèric	<ul style="list-style-type: none"> - Unió forta i estable - Reproductibilitat 	<ul style="list-style-type: none"> - Orientació aleatòria de l'anticòs - Possible alteració del fragment Fab
Enllaç covalent controlat (Marcatge a través dels carbohidrats o ponts disulfur de l'Ig)	<ul style="list-style-type: none"> - Unió forta i estable - Control de l'orientació 	<ul style="list-style-type: none"> - Modificació química prèvia de l'anticòs
Sistema biotina/avidina	<ul style="list-style-type: none"> - Unió forta i estable - Recobriment eficient de la superfície - Possible control de l'orientació 	<ul style="list-style-type: none"> - Modificació química prèvia de l'anticòs - Possible alteració del fragment Fab

Objectius

L'objectiu principal plantejat per a aquest treball experimental ha estat l'estudi i establiment d'una metodologia senzilla d'immobilització d'anticossos per al desenvolupament d'immunoassajos directes en biosensors òptics. Per a tal fi, s'han considerat dos objectius parcials:

(A) Dur a terme un estudi comparatiu entre diverses estratègies d'immobilització d'anticossos sobre una superfície sensora, prenent com a biosensor model l'SPR i s'han avaluat en termes de sensibilitat, estabilitat i reproductibilitat.

S'han escollit 3 estratègies d'immobilització:

- (i) Unió covalent genèrica, considerada com a estratègia model o estàndard.
- (ii) Captura d'anticossos per afinitat sobre Proteïna G, la qual permet una immobilització orientada de l'anticòs.
- (iii) Captura d'anticossos per afinitat amb una estructura orgànica basada en calixarens, el ProlinkerTM [33].

(B) En aquella estructura amb millors resultats, avaluar condicions addicionals que permeten minimitzar adsorcions inespecífiques amb matrius biològiques complexes com sèrum o orina.

Resultats i Discussió

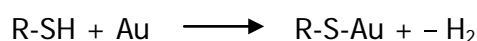
1. Consideracions prèvies

L'estudi i optimització de diferents estratègies s'ha dut a terme en un biosensor SPR desenvolupat al nostre grup. Els biosensors SPR són dispositius òptics sensibles i versàtils, permeten el seguiment de les interaccions entre molècules sense necessitat de marcadors i en temps real, proporcionen informació relacionada amb l'especificitat, la cinètica i l'afinitat de la interacció^[34], i poden detectar analits d'interès d'una mostra en un ampli rang de pesos moleculars donant informació de la seua concentració, directament relacionada amb el nivell de resposta. A més, els biosensors SPR són instruments senzills i robustos, permetent assajos ràpids d'elevada fiabilitat i reproductibilitat. Per aquesta raó, els biosensors SPR s'empren com a instrument de rutina al nostre laboratori per dur a terme estudis i optimitzacions de metodologies que després podran ser transferides a altres dispositius òptics biosensors de major complexitat i sensibilitat.

El dispositiu SPR emprat es basa en la configuració Kretschmann a angle d'incidència fix, de manera que s'enregistra a temps real la variació en la intensitat de la llum reflectida. Amb aquesta configuració es pot fer el seguiment de les interaccions biomoleculares en temps real. A més a més,

el dispositiu consta de dues cel·les independents de mesura, permetent dur a terme un major nombre d'anàlisis.

Els biosensors SPR empen, generalment, superfícies sensores recobertes d'una nanocapa d'or (~50 nm) que es funcionalitza mitjançant compostos químics amb grups tiol (-SH) que s'adhereixen a la superfície per un procés anomenat quimisorció. La quimisorció sobre or es considera com una reacció d'oxidació-adsorció del grup tiol seguida d'una posterior eliminació reductiva de l'hidrogen, tal com es veu a l'equació següent:



Es tracta d'una interacció molt forta que permet formar una matriu química sobre la superfície sensora d'elevada estabilitat i, per tant, proporciona una immobilització fiable i reproducible.

Tanmateix, amb l'objectiu de poder transferir les estratègies d'immobilització d'anticossos a qualsevol tipus de biosensor, en la funcionalització de la superfície sensora s'ha tingut en compte l'ús de compostos químics que tinguen compostos anàlegs que puguen fer-se servir en la funcionalització d'altres tipus de superfície, com ara vidre o silici.

En aquest sentit, plantejant aquest treball com un estudi comparatiu entre diverses estratègies d'immobilització previ al disseny i optimització d'una metodologia vàlida i que puga ser transferida a altres dispositius biosensors, un factor d'elevada importància ha sigut la qualitat i puresa dels reactius emprats, per tal d'assegurar-ne la fiabilitat i reproductibilitat dels resultats.

Pel que fa al sistema antigen/anticòs, es va escollir l'hormona gonadotropina coriònica humana (hCG) i un anticòs monoclonal específic (anti-hCG) com a parell model per dur a terme l'estudi i optimització de les diferents estratègies. L'anticòs va ser prèviament produït pel Dr. Rodríguez Frade del Centre Nacional de Biotecnologia (CNB-CSIC) i cedit per dur a terme aquests experiments. Es tractava d'un anticòs monoclonal produït en ratolí i pertanyent a la subclasse d'immunoglobulines IgG1. Com a pas previ, l'anticòs va ser purificat per tal d'assegurar la reproductibilitat tant en la immobilització com en la posterior detecció de l'antigen. Els anticossos monoclonals es troben en el líquid ascític de l'animal hoste, de manera que es poden emprar directament per dilució, o bé, introduint etapes de purificació prèvia que permeten eliminar altres components com ara proteïnes que poden acabar interferint. En aquest sentit, una primera purificació es basa en la precipitació d'IgG mitjançant sulfat d'amoni $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que permet eliminar proteïnes tot i que no és eficient al 100%. Per això, sovint s'incorpora una purificació addicional, essent la cromatografia d'afinitat en columna el procés més habitual. L'estratègia es basa en l'ús d'un tipus de proteïnes (A, G o L) que tenen especial afinitat per la fracció constant dels anticossos i que es troben immobilitzades en una

fase sòlida empaquetada en una columna d'extracció. En aquest cas, les IgG1 de ratolí tenen molta afinitat per la Proteïna G.

El procediment experimental de purificació, que pot veure's a la Part Experimental, consisteix en fer passar una solució de l'anticòs sobre la columna d'afinitat, de manera que sota les condicions adients de pH i força iònica, els anticòssos hi queden retinguts. Les interaccions específiques basades principalment en forces electrostàtiques i ponts d'hidrogen es trenquen canviant les condicions de pH del medi (neutre a àcid), i permetent l'elució de fraccions pures d'IgGs. Es tracta d'una metodologia ràpida, fiable i que condueix a rendiments de recuperació de l'anticòs força elevats.

2. Optimització de les estratègies d'immobilització

Les tres estratègies d'immobilització estudiades en aquest treball foren les següents:

- (i) la formació d'un enllaç covalent de l'anticòs a una monocapa autoensablada d'alcanotriols (Figura 7a)
- (ii) la captura per afinitat per part de la proteïna G de la regió Fc dels anticòssos (Figura 7b);
- (iii) la interacció tipus hoste-amfitrió de l'anticòs sobre una monocapa de Prolinker B (Figura 7c).

L'estratègia (i) fou considerada com a metodologia estàndard, donat el seu ampli ús, tot i tractar-se *a priori* de la menys eficient en termes d'orientació d'anticòssos. L'estratègia (ii) es pot considerar també prou coneguda donat l'ús que fa precisament de proteïnes d'afinitat comentades breument en l'apartat anterior, i en aquest cas, ja s'introdueix una orientació dirigida dels anticòssos. Finalment, l'estratègia (iii) ofereix certs aspectes que la fan atractiva com a alternativa universal, i ha estat menys desenvolupada.

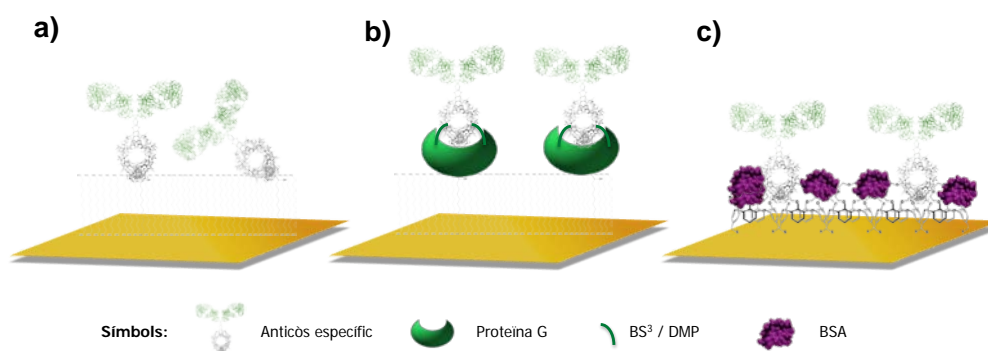


Figura 7.- Estratègies d'immobilització d'anticòssos sobre una superfície d'or. a) Enllaç covalent sobre una SAM d'alcanotriols funcionalitzats. **b)** Captura per afinitat sobre proteïna G immobilitzada i fixament de la biosuperfície amb entrecruadors (BS³/DMP). **c)** Interacció hoste-amfitrió sobre una monocapa de Prolinker B i bloqueig amb BSA.

1.1 Estratègia Covalent

Aquesta metodologia és una de les més emprades en biofuncionalització de superfícies sensores; per aquesta raó es pren com a referent per valorar els resultats de les diferents estratègies estudiades.

En aquesta estratègia s'immobilitza l'anticòs per formació d'un enllaç covalent entre la biomolècula i una monocapa autoensablada d'alcanotiols (R-SH), formada prèviament per quimisorció sobre la superfície sensora d'or. L'enllaç covalent es tracta, en aquest cas, d'un enllaç amida entre els grups amina primària (-NH₂) de les lisines (Lys) de la immunoglobulina i grups carboxílics (-CO₂H) d'alcanotiols de cadena llarga funcionalitzats. L'ús d'alcanotiols de cadena llarga, formats per cadenes de més de 10 carbonis, produeix SAMs més denses i ordenades, de forma semblant a una estructura cristal·lina. En aquest cas es va emprar una monocapa mixta d'àcid mercaptoundecanoïc (MUA) i mercaptoundecanol (MUOH) en proporció 1:20. Aquesta proporció, on dominen grups terminals alcohol en comparació amb els grups carboxílics responsables de la unió covalent, permet controlar l'ordenament i densitat de les biomolècules en la superfície, maximitzant l'eficiència de la immobilització, augmentant previsiblement l'espaiat entre biomolècules significativament grans com els anticossos (150 kDa) i reduint per tant l'impediment estèric^[35-36].

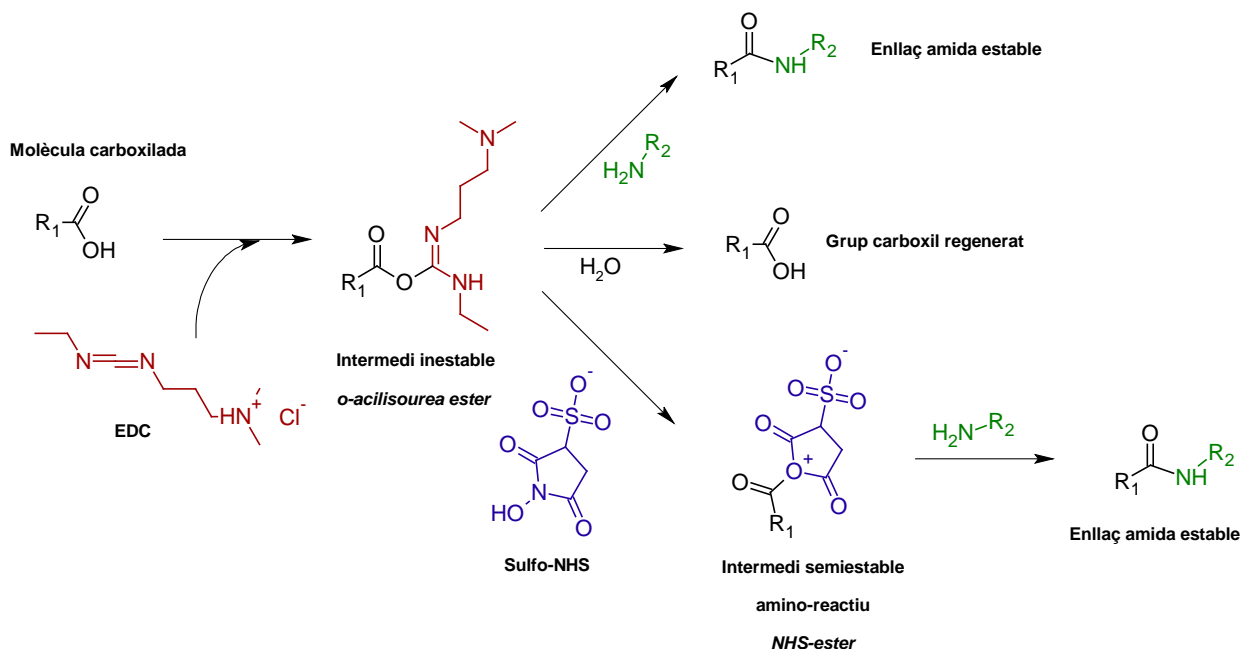
La formació de la SAM sobre la superfície d'or es va portar a terme *ex-situ* ja que cal una dissolució dels alcanotiols en etanol, i per l'elevada volatilitat del dissolvent no és recomanable injectar-lo al dispositiu SPR. Després de la neteja del xip, es va submergir en una dissolució etanòlica de MUA i MUOH i es va deixar aproximadament 12 hores a temperatura ambient. Després, la superfície es va esbandir amb etanol i aigua i es va assecar amb un corrent de N₂ abans d'acoblar-la al dispositiu SPR.

L'anticòs va ser immobilitzat sobre la superfície de la monocapa mitjançant l'activació produïda per la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) i la N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) (Esquema 1).

Aquest mètode d'activació dels grups carboxílics és un procediment molt emprat en bioconjugació, en el qual es fa reaccionar el grup carboxílic amb la molècula d'EDC formant un intermedi reactiu que pot reaccionar directament amb un grup amina de la biomolècula. No obstant, l'intermedi és molt inestable i s'hidrolitza fàcilment en dissolucions aquoses, que és el medi més adient per mantenir la integritat de les biomolècules; per això, s'addiciona sulfo-NHS (versió modificada amb un grup sulfònic de l'N-hidroxisuccinimida (NHS), que n'augmenta la polaritat i la solubilitat en

aigua) que reacciona amb l'intermedi per formar un éster amb un major vida mitja, el que permet augmentar el rendiment d'acoblament posterior amb els grups amino de la biomolècula.

Esquema 1.- Activació de grups carboxílics mitjançant EDC/NHS



Una vegada unit l'anticòs a la SAM es fa passar etanolamina, que s'uneix als grups carboxílics activats que no s'hagen bioconjugat, bloquejant la superfície i evitant unions covalents posteriors no desitjades de l'anàlit a la monocapa d'alcanotriols (Figura 8).

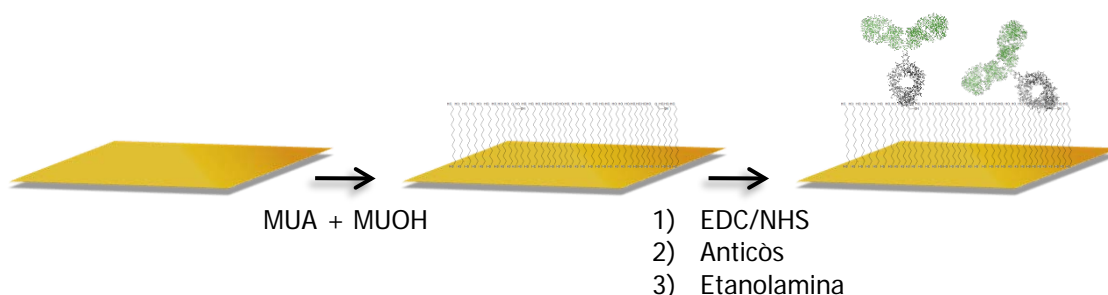


Figura 8.- Estratègia d'immobilització per unió covalent. Formació de la SAM mixta d'àcid mercaptoundecanoic i mercaptoundecanol (MUA:MUOH, 1:20) (*ex-situ*). Activació de grups carboxílics amb EDC/NHS, unió de l'anticòs i bloqueig de grups carboxílics activats amb etanolamina.

El procés d'immobilització d'anticòs pot seguir-se en temps real, observant-se els canvis en la intensitat de la llum reflectida degut als canvis d'índex de refracció que ocorren durant tot el procés a la superfície del biosensor. Com s'ha comentat a la introducció, en el cas del SPR el camp

evanescent té una penetració en el medi adjacent a la superfície d'uns pocs centenars de nm (100-500 nm) de manera que en temps real no només s'observaran els canvis d'índex resultants de l'establiment d'interaccions sobre l'or, sinó també aquells resultants del dissolvent que hi circula. Això es pot observar en la Figura 9a, on per cada una de les tres etapes s'observen variacions d'intensitat molt elevades. Quan tenim un dissolvent en flux continu, en aquest cas aigua, si fem passar un altre dissolvent per la superfície del sensor, aquest provocarà un canvi d'índex de refracció de més o menys intensitat depenent de la seua naturalesa. Si hi ha alguna interacció molecular a la superfície d'or, la intensitat de la llum reflectida a l'eixida del reactiu serà diferent a la intensitat abans d'entrar (com a resultat d'un canvi d'IR de manera que un major IR indica unió sobre la superfície, i una variació negativa, una desorció). Per tant, la senyal generada per cada interacció s'obté com la diferència entre la intensitat de la llum a la sortida menys la de l'entrada i s'expressa en variació de reflectància (ΔR_{pp}).

Així doncs, en la immobilització de l'anticòs per unió covalent s'observa una línia base corresponent al flux d'aigua en continu, en primer lloc ocorre el canvi d'IR degut al dissolvent emprat en l'activació dels grups carboxílics amb EDC/NHS i on es pot observar que la línia base després de l'activació no queda a la mateixa altura que a l'entrada; això és significatiu que hi ha hagut una interacció molecular i hi ha hagut un canvi químic en la superfície sensora. Posteriorment s'injecta l'anticòs en una dissolució amortidora a pH 7 que també provoca un canvi d'IR respecte l'aigua i on, de la diferència d'intensitat de la llum entre l'eixida i l'entrada s'obté la senyal, que serà proporcional a la quantitat d'anticòs que s'haja immobilitzat. Per últim es fa passar l'etanolamina dissolta en aigua a pH 9, la qual també causa un canvi d'IR al seu pas per la superfície del sensor.

Un dels objectius del procés de biofuncionalització és aconseguir un recobriment eficient de la superfície sensora minimitzant la quantitat de bioreactius emprada, amb la fi de reduir costos. En aquest sentit, malgrat que generalment en immunoassajos directes s'empen concentracions d'anticòs de l'ordre de 100 $\mu\text{g/mL}$ ^[37-38], es va optar per immobilitzar concentracions baixes (10 i 20 $\mu\text{g/mL}$) d'anticòs (Figura 9b) i estudiar la influència que té la densitat de recobriment de la superfície respecte la sensibilitat en la detecció.

La senyal de resposta de la immobilització en aquesta estratègia ($< 1\Delta R_{pp}$) indica una baixa densitat d'anticòs immobilitzat, tenint en compte que l'anticòs té un pes molecular al voltant de 150 kDa i hauria de produir un canvi de senyal major si s'immobilitza en una densitat elevada.

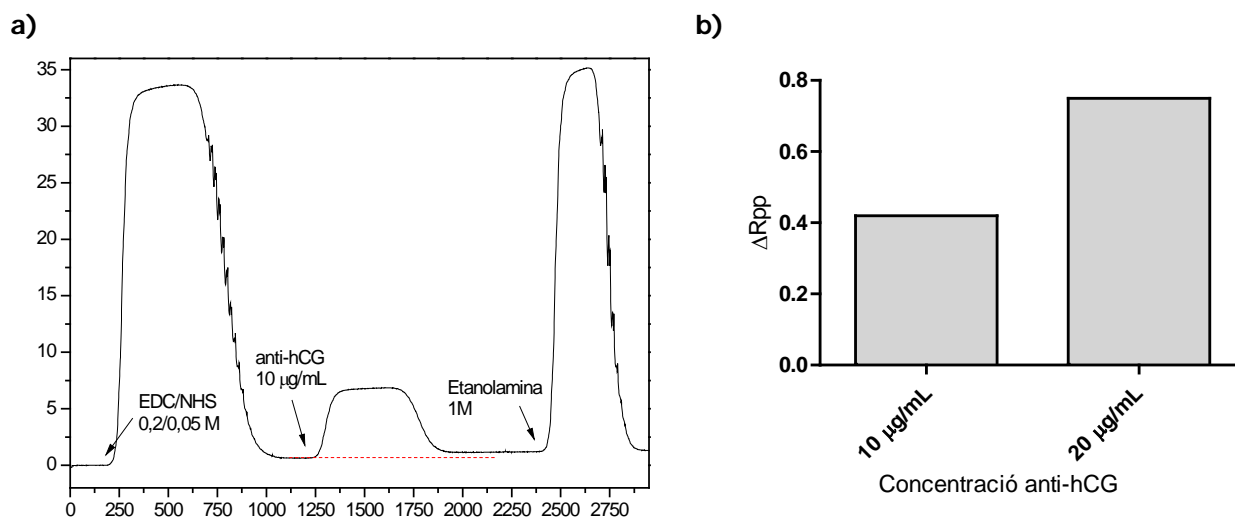


Figura 9.- Estratègia d'immobilització covalent de l'anti-hCG. a) Sensograma del procediment d'immobilització covalent d'anti-hCG a 10 $\mu\text{g/mL}$ en PBS en un biosensor SPR. b) Senyals de resposta d'anticòs immobilitzat a distintes concentracions (10 i 20 $\mu\text{g/mL}$).

Pel que fa a la detecció de l'hCG (Figura 10a), en primer lloc s'estudià la possibilitat de regenerar la biosuperfície, trencant les interaccions entre l'antigen i l'anticòs, per permetre múltiples mesures sobre la mateixa superfície biofuncionalitzada. En aquest cas, un canvi de pH del medi, de pH neutre a pH àcid (HCl 5 mM), permet trencar la interacció entre l'hCG i l'anti-hCG de manera eficient (la línia base després d'injectar el medi àcid recupera la posició inicial prèvia a la injecció d'hCG, indicatiu de trencament de totes les interaccions) i sense afectar els enllaços covalents que mantenen l'anticòs immobilitzat sobre la superfície.

Sota aquestes condicions, es realitzaren corbes de reconeixement de l'antigen en les diferents concentracions d'anticòs immobilitzat (Figura 10b). En aquest cas, no s'observa una diferència significativa en la sensibilitat de la detecció si s'empren 10 o 20 $\mu\text{g/mL}$. Pel que fa a la sensibilitat de la detecció, es va calcular el límit de detecció teòric d'hCG amb 10 $\mu\text{g/mL}$ d'anti-hCG immobilitzat que va resultar en 0.427 $\mu\text{g/mL}$; tenint en compte l'ajust de la corba com una interacció específica d'un lloc d'unió i considerant que el senyal corresponent a 3 vegades la desviació estàndard del soroll de l'aparell (injecció del solvent en continu).

La relativament baixa sensibilitat, comparada amb els límits de detecció que es poden aconseguir amb un biosensor SPR^[11], pot explicar-se per diverses raons: (i) l'activació dels grups carboxílics i la formació de l'enllaç covalent es realitza *in-situ* sota condicions de flux, de manera que es produeix durant un període aproximat de 30 minuts, el que podria conduir a un rendiment baix d'immobilització; (ii) cal tenir en compte que els anticòs presenten grups amina lliures en tota la seua estructura, susceptibles de reaccionar amb la superfície, inclosa la zona de reconeixement. En

no haver cap control de la seua orientació, seria d'esperar que part dels anticossos immobilitzats estiguessen inaccessibles.

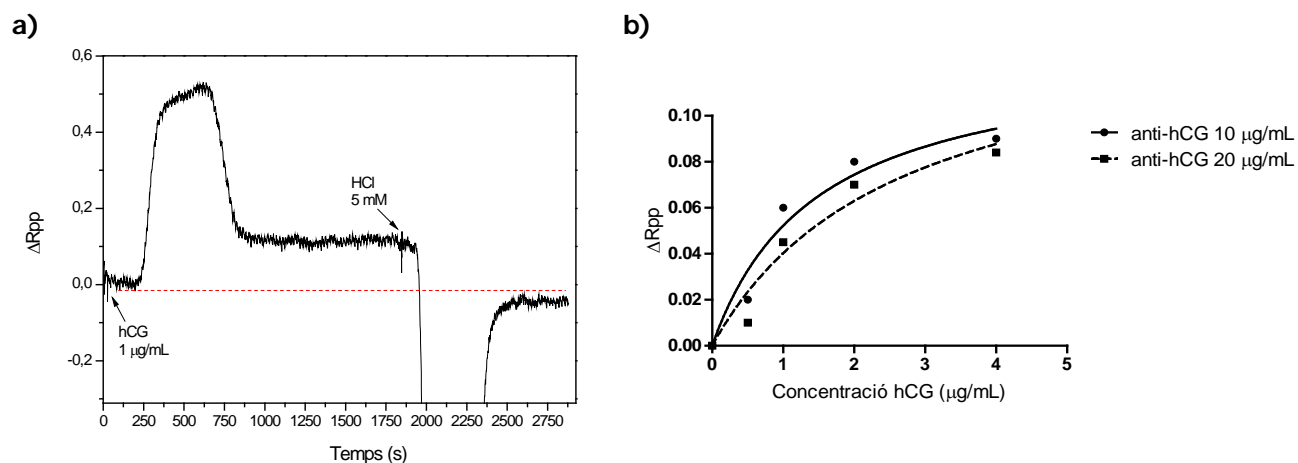


Figura 10.- Detecció d'hCG en l'estratègia covalent. a) Sensograma de la detecció d'hormona hCG a 1 µg/mL en PBS i posterior regeneració de la superfície amb HCl 5 mM. **b)** Corbes de reconeixement d'hCG a anti-hCG (10 i 20 µg/mL) immobilitzat covalentment sobre la superfície sensora.

1.2 Estratègia Proteïna G

Tal i com s'ha comentat prèviament, les proteïnes A i G són proteïnes d'afinitat que presenten la peculiaritat de contenir àrees de reconeixement específic contra els anticossos, en particular presenten una elevada afinitat per la regió Fc de diversos tipus d'immunoglobulines. Degut a aquestes característiques, tant les proteïnes A i G, com una combinació d'ambdues, proteïna A/G, són àmpliament emprades com a lligand immobilitzat en la fase sòlida en cromatografies d'afinitat analítiques i preparatòries^[39-43]. La proteïna G en particular ha demostrat ser molt útil en una gran varietat d'aplicacions bioanalítiques per l'eficient captura orientada d'anticossos per a la detecció de bacteris^[44-45], en estudis cinètics^[46], i per a la quantificació d'IgG en aplicacions industrials^[47].

La proteïna G prové de l'*Streptococcus* i la proteïna A de l'*Staphylococcus* i a pesar que ambdues són receptors eficients de la part Fc de diverses immunoglobulines, les diferències estructurals entre elles fan que presenten afinitats distintes depenent del tipus i subtipus d'immunoglobulina a capturar, com es pot veure a la Taula 2. La proteïna G cobreix un rang major de subtipus d'immunoglobulines i sovint amb major afinitat. En el nostre cas treballàvem amb un anticòs monoclonal de ratolí tipus IgG1; i per tant es va escollir la proteïna G com a proteïna de captura per a la immobilització, d'igual manera que fou seleccionada per a la purificació de l'anticòs.

Taula 2.- Afinitats de la Proteïna A/G pels tipus d'IgG de diferents espècies

Espècie	Immunoglobulina	Afinitat de la Proteïna A	Afinitat de la Proteïna G
Humà	IgG (normal)	++++	++++
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++
	IgG3	-	++++
	IgG4	++++	++++
	IgM	-	-
	IgA	-	-
	IgE	-	-
Ratolí	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
Rata	IgG1	-	+
	IgG2a	-	++++
	IgG2b	-	++
	IgG2c	+	++
Cabra	IgG	+/-	++
Conill	IgG	++++	+++
Ovella	IgG	+/-	++

La proteïna G és una proteïna heterodimèrica amb dos llocs d'unió d'elevada afinitat per la regió Fc i a més, tot i que la proteïna en estat natiu també presenta certa afinitat pels fragments Fab, un 10%, l'enginyeria genètica moderna ha permès el disseny de proteïna G recombinant amb una quasi nul·la afinitat per les regions Fab i major afinitat per la part Fc dels anticossos^[48].

Així doncs, l'estratègia d'immobilització orientada d'anticossos sobre proteïna G seguida va consistir en primer, unir covalentment aquesta proteïna a una monocapa d'alcanotols (MUA/MUOH 1:20) seguint l'estratègia prèviament comentada. A continuació s'addicionaren els anticossos, que per afinitat queden units en l'orientació correcta, és a dir, deixant exposats els fragments Fab (Figura 11).

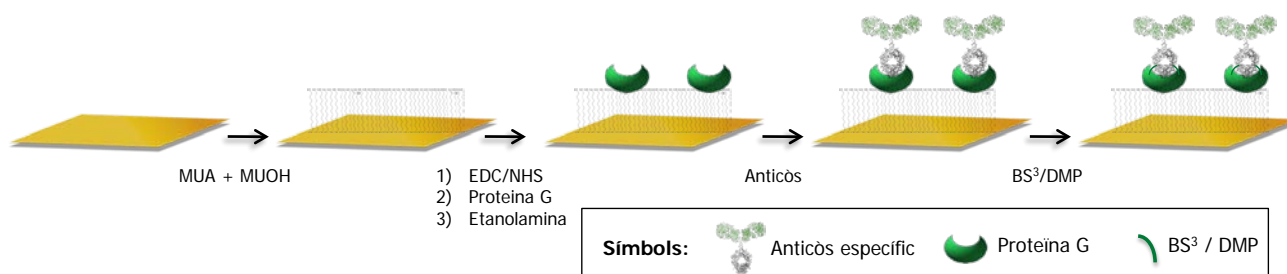


Figura 11.- Estratègia d'immobilització per captura sobre proteïna G. Formació de la SAM mixta d'àcid mercaptoundecanoic i mercaptoundecanol (MUA:MUOH, 1:20) (*ex-situ*); activació de grups carboxílics amb EDC/NHS, unió de la proteïna G i bloqueig dels grups activats amb etanolamina; captura orientada de l'anticòs per afinitat de la proteïna G per la regió Fc; estabilització de la monocapa amb entrecreuadors que fixen l'anticòs a la Proteïna G.

La captura per afinitat de les immunoglobulines es basa en forces electrostàtiques i hidrofòbiques entre les dues proteïnes i per aquesta raó, és un procés que depèn molt de la força iònica i del pH del medi. A més, es tracta d'interaccions supramoleculares, l'anticòs podria desadsorbir-se de la proteïna G en un canvi de les condicions del medi i per tant, es decidí introduir una etapa addicional que permetés estabilitzar la capa d'element de reconeixement i fera possible la regeneració de la biosuperfície sense perdre els anticossos immobilitzats.

Amb aquest objectiu, es va estudiar el comportament de dos tipus de molècules capaces d'enllaçar químicament les immunoglobulines a la proteïna G a través dels seus grups amina lliures. La primera és el dimetil pimelidat (DMP), una molècula homobifuncional amb dos grups imidoester que reaccionen fàcilment amb grups amina a pH elevat i que presenta un braç espaiador de 9.2 Å; la segona molècula, el bis(sulfosuccinimidil) suberat (BS³) reacciona també, en aquest cas a pH neutre o àcid, amb grups amina lliures de qualsevol molècula a través dels grups sulfo-NHS dels seus extrems separats 11.4 Å (Figura 12).

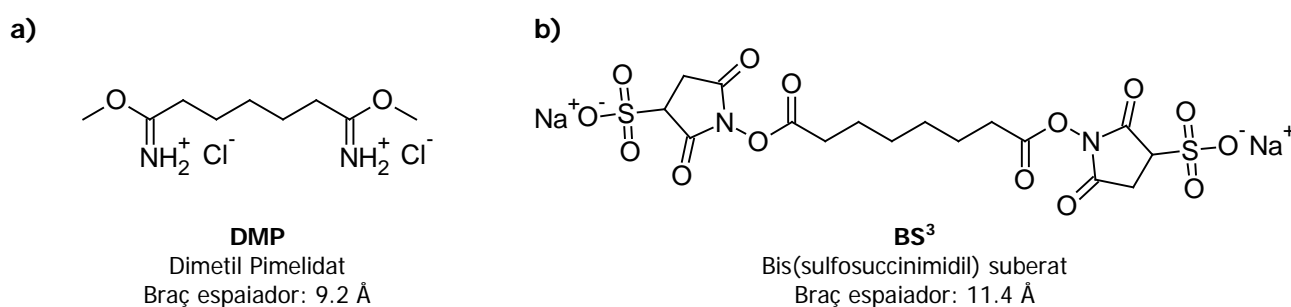


Figura 12.- Molècules d'entrecreuament

Es va optimitzar l'ús d'aquestes molècules entrecruadores des de diversos punts de vista, tenint en compte factors com la concentració, que ha de ser l'adient per poder fixar l'anticòs a la proteïna G sense afectar significativament a la detecció. S'havia de tenir en compte que podien reaccionar amb grups amina del propi anticòs, alterant l'estructura i afectant a la detecció de l'antigen. La llargària del braç espaiador també pot ser un factor clau en tant que la llargada i flexibilitat de la molècula entrecruadora té una influència important a l'hora de reaccionar amb un grup amino de l'anticòs i un altre de la proteïna G.

Així doncs, en aquesta estratègia es va optimitzar cadascuna de les etapes: primer l'optimització de la immobilització de la proteïna G sobre la monocapa d'alcanotols (Figura 13a), provant distintes concentracions (20, 50, 80 i 100 µg/mL) (Figura 13b).

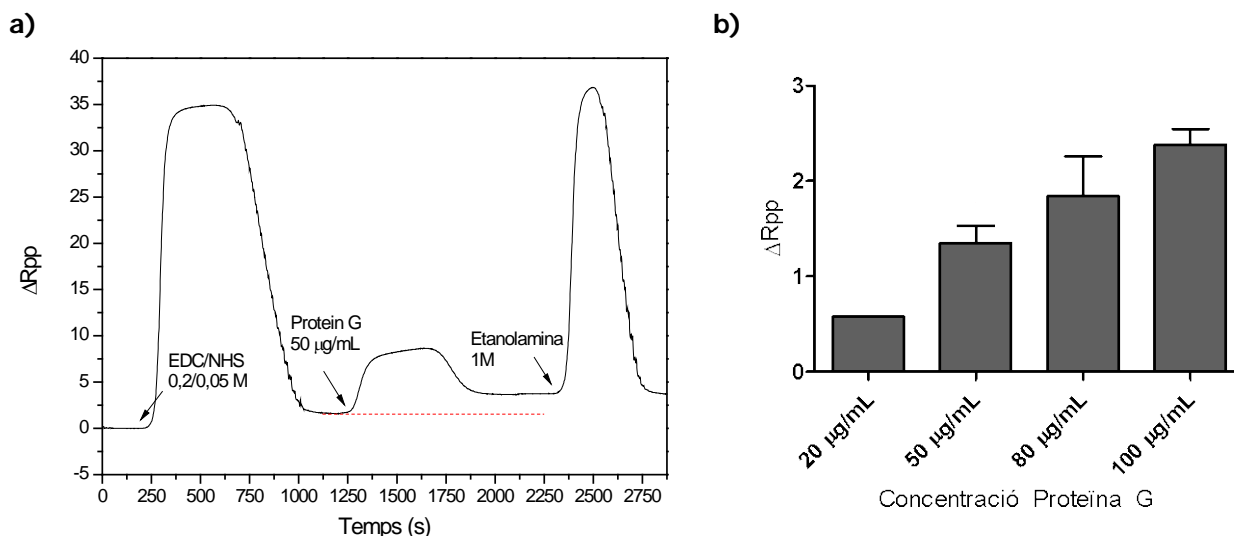


Figura 13.- Estratègia d'immobilització de la Proteïna G. a) Sensograma del procediment d'immobilització covalent de Proteïna G a 50 µg/mL en PBS. **b)** Senyals de resposta de la unió covalent de Proteïna G a diferents concentracions (20, 50, 80 i 100 µg/mL).

A continuació es va optimitzar l'etapa d'immobilització d'anticòs per captura, estudiant, en primer lloc, l'efecte del pH. Els resultats mostren que la immobilització d'anticòs sobre proteïna G té major rendiment en medi àcid (pH 5.0) que en medi neutre (Figura 14a), ja que s'afavoreix la interacció quan el pH es troba per davall del punt isoelectríc de les proteïnes ($pI \sim 6.0$). Una vegada establerta la immobilització a pH 5.0, es va estudiar la influència de la concentració de Proteïna G en la densitat d'anticòs immobilitzat.

A la Figura 14b es mostra la senyal de 10 µg/mL d'anticòs immobilitzat sobre diferents concentracions de Proteïna G (20, 50, 80 i 100 µg/mL); s'observa que a partir de 50 µg/mL de Proteïna G immobilitzada, no hi ha un augment significatiu de la quantitat d'anticòs capturat. Per això i tenint en compte la minimització en l'ús de reactius, es va decidir continuar l'optimització de l'estratègia emprant una concentració de 50 µg/mL de Proteïna G. Pel que fa a la concentració d'anticòs, es va avaluar la capacitat de recobriment de la capa proteica a dues concentracions distintes d'anti-hCG (10 i 20 µg/mL) obtenint, com s'esperava, major densitat de bioreceptor immobilitzat a major concentració (Figura 14c).

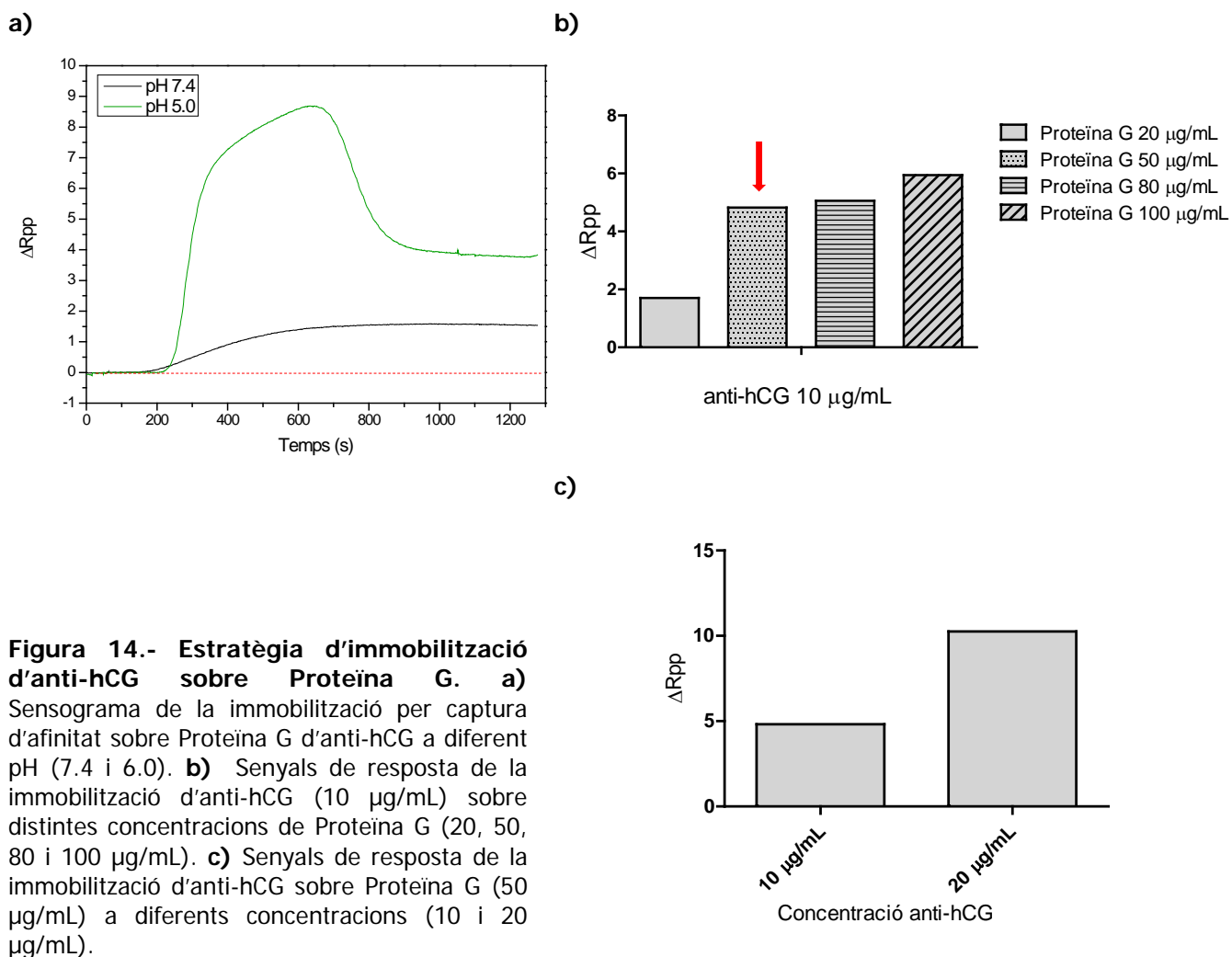


Figura 14.- Estratègia d'immobilització d'anti-hCG sobre Proteïna G. **a)** Sensograma de la immobilització per captura d'afinitat sobre Proteïna G d'anti-hCG a diferent pH (7.4 i 6.0). **b)** Senyals de resposta de la immobilització d'anti-hCG (10 µg/mL) sobre distintes concentracions de Proteïna G (20, 50, 80 i 100 µg/mL). **c)** Senyals de resposta de la immobilització d'anti-hCG sobre Proteïna G (50 µg/mL) a diferents concentracions (10 i 20 µg/mL).

Posteriorment es va avaluar l'eficiència de les molècules entrecruadores per tal de fixar l'anticòs a la proteïna G i evitar la seua pèrdua durant la regeneració de la superfície després de cada immunoassaig.

En aquest sentit, tal i com s'observa a la Figura 15a, si no s'afegeix cap tipus d'entrecruador que estabilitze la biosuperfície, en canviar les condicions de pH del medi per tal de regenerar, bona part de l'anticòs immobilitzat per captura sobre la proteïna G es perd en comparació amb els assajos realitzats en biosuperfícies fixades amb DMP o BS³. Entre aquestes dues molècules s'observa una major eficiència del BS³, que permet trencar la interacció antígen/anticòs sense que es veja afectat l'anticòs immobilitzat. Les raons de la major eficiència d'aquesta molècula podrien estar relacionades amb la llargària del braç espaciador, que dóna major flexibilitat per reaccionar amb una amina de la proteïna G i altra de la immunoglobulina; fixant millor i més quantitat d'anticòs a la proteïna G i reduint la possibilitat que reaccione amb dues amines del propi anticòs.

També es pot observar una petita pèrdua de sensibilitat en la detecció de l'analit respecte a l'estratègia sense entrecreudadors, això és degut a que inevitablement, certa quantitat de molècules entrecreadores poden reaccionar amb residus d'amina dels fragments Fab de l'anticòs, alterant-ne l'afinitat per l'antigen.

En l'optimització d'aquesta estratègia també es va avaluar l'especificitat de la detecció, fent passar una proteïna control, l'albumina de sèrum boví (BSA). Els resultats demostren que la detecció d'hCG per part de l'anti-hCG és específica, havent una diferència significativa de senyal entre l'analit d'interès i la proteïna control (Figura 15b).

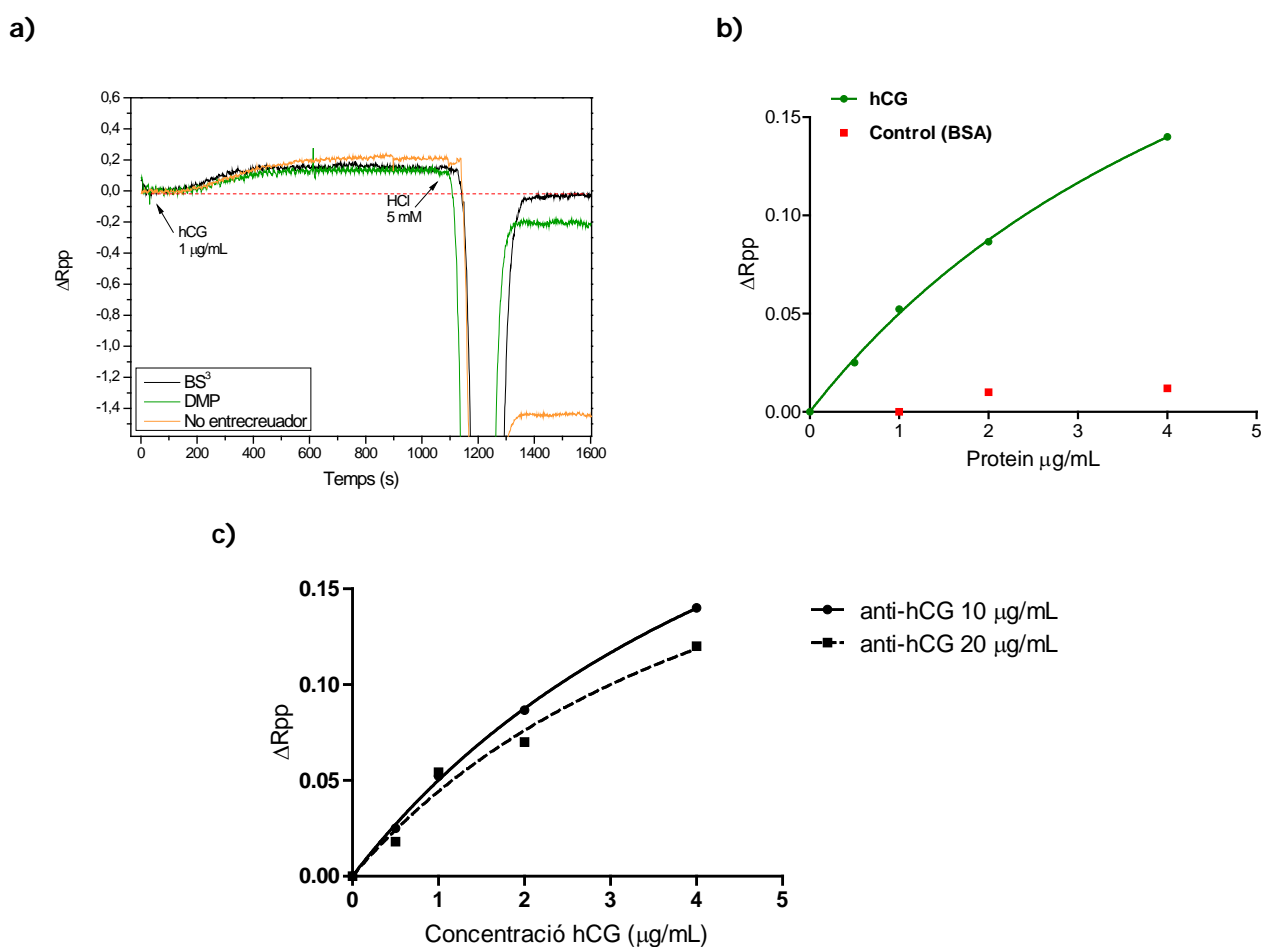


Figura 15.- Resultats de l'optimització de la detecció d'hCG en l'estratègia Proteïna G. **a)** Sensograma de la detecció d'hCG a 1 $\mu\text{g/mL}$ en PBS i posterior regeneració amb HCl 5 mM en les diferents estratègies d'immobilització d'anticòs sobre la Proteïna G: sense molècula d'entrecreuament (taronja), amb DMP (verd) i amb BS³ (negre). **b)** Control d'especificitat de la detecció d'hCG en l'estratègia d'immobilització d'anti-hCG (10 $\mu\text{g/mL}$) sobre Proteïna G (50 $\mu\text{g/mL}$): corba d'unió específica d'hCG (verd), adsorció inespecífica de BSA com a proteïna control (roig). **c)** Corbes de reconeixement d'hCG a anti-hCG immobilitzat sobre Proteïna G (50 $\mu\text{g/mL}$) a diferents concentracions (10 i 20 $\mu\text{g/mL}$).

D'altra banda, es va estudiar la influència de la concentració d'anticòs immobilitzat en la sensibilitat de la detecció d'antigen, realitzant corbes de reconeixement amb 10 i 20 $\mu\text{g/mL}$ d'anticòs immobilitzat (Figura 15c). Novament, tampoc es va observar una diferència significativa entre les dues concentracions d'anticòs provades. El LOD calculat per a la corba de detecció amb 10 $\mu\text{g/mL}$

d'anticòs va resultar de 0.372 $\mu\text{g}/\text{mL}$; lleugerament menor que l'aconseguit amb l'estratègia covalent, tot i que caldria esperar valors millors donada l'orientació afavorida dels anticossos. Aquests resultats podrien ser indicatius d'una influència negativa de l'ús de l'entrecruador en l'estabilitat de la capa de reconeixement.

1.3 Estratègia Prolinker

La modificació química de les biomolècules és evident que pot resultar un factor clau en termes d'estabilitat d'aquestes, i a la vegada de la funcionalitat i integritat de les mateixes de cara a reconèixer, per exemple en aquest cas, els analits diana. La recerca en mètodes d'immobilització d'anticossos en aquest sentit ha permès desenvolupar noves estratègies i dissenyar noves molècules que permeten la captura orientada de l'anticòs, immobilitzant-lo a través de forces electrostàtiques i hidrofòbiques que no modifiquen químicament l'estructura de la immunoglobulina.

Així, Y. Lee *et. al.*^[33] han sintetitzat una molècula derivada d'un calixaré, ProlinkerTM B (Figura 16a), que permet immobilitzar anticossos a través de la regió Fc fent servir interaccions hoste-amfitrió entre els grups amina ionitzats i una corona d'èters. A més, la molècula conté grups tiol que permeten la quimisorció directa sobre l'or i la formació d'una monocapa capaça de cobrir tota la superfície evitant l'absorció inespecífica sobre el metall^[49]; i compta també amb grups metoxi (-OCH₃), els quals es creu que contribueixen a la immobilització de l'anticòs per interaccions hidrofòbiques amb els residus accessibles de la immunoglobulina (Figura 16b).

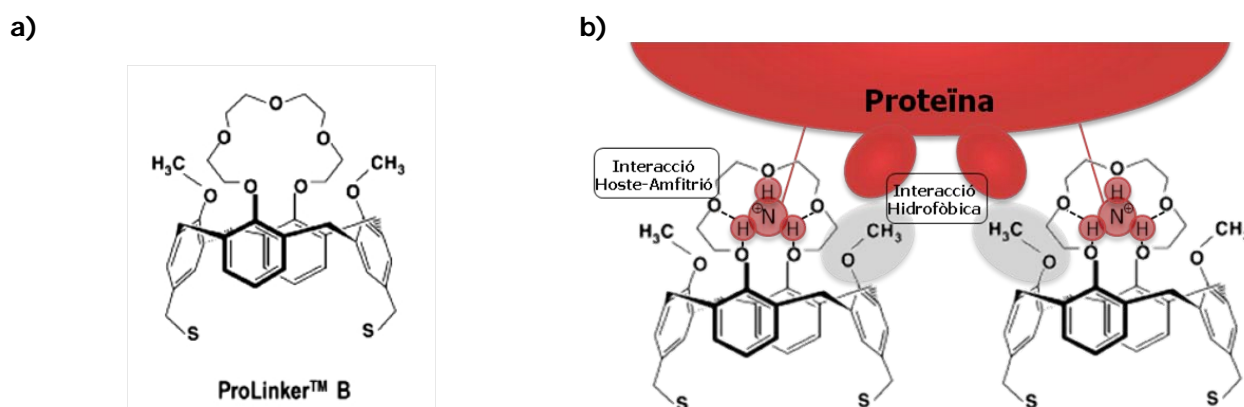


Figura 16.- a) Estructura química del ProlinkerTM B, b) Mecanisme d'interacció amb la proteïna a través dels grups $-\text{NH}_3^+$ i $-\text{OCH}_3$.

Aquest tipus de molècula es mostra doncs com un candidat prometedor a la immobilització d'anticossos en orientació controlada, sense manipulació ni modificació química. A més, el mateix grup ha sintetitzat també un compost anàleg (ProlinkerTM A)^[33] que incorpora grups aldehids en lloc de grups tiols a la seva estructura i que permet la immobilització sobre superfícies de vidre o sílice.

Aquesta estratègia doncs, obriria el ventall de possibilitats d'ús, fent-la fàcilment transferible a altres tipus de biosensor.

L'estratègia d'immobilització orientada amb el Prolinker comença amb la formació *ex-situ* d'una monocapa de Prolinker™ B sobre la superfície d'or. Aquesta monocapa s'ha de realitzar *ex-situ* degut a que és una molècula orgànica només soluble en dissolvents orgànics com el cloroform (CH_2Cl) que, sota les condicions òptiques de mesura establertes en el dispositiu al laboratori, impedeix una monitorització en temps real, de manera similar al cas de la formació de SAM mixta amb etanol com a dissolvent. Una vegada formada la monocapa de Prolinker, es renta i es rehidrata per tal d'iniciar la immobilització de l'anticòs. Així doncs, una vegada acoblat el xip al dispositiu, directament es fa passar la dissolució d'anticòs que quedarà immobilitzat en l'orientació correcta i a continuació es fa passar BSA per tal de bloquejar la superfície i reduir l'adsorció no específica (Figura 17). La BSA és una proteïna amb grups amino terminals que poden interaccionar amb les molècules de Prolinker que no hagen reaccionat amb l'anticòs i d'aquesta manera evitar que les molècules d'analit o altres proteïnes no específiques puguin adsorbir-se per aquesta via donant lloc a senyal inespecífica.

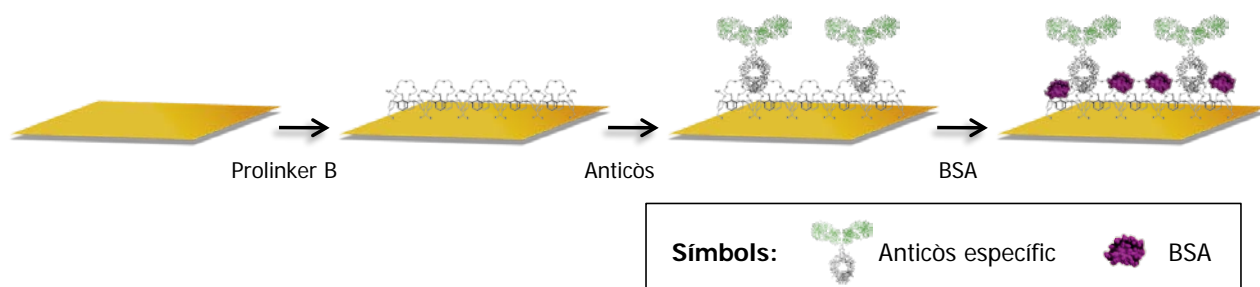


Figura 17.- Estratègia d'immobilització per captura sobre Prolinker. Formació de la monocapa de Prolinker™ B. Immobilització de l'anticòs per interacció hoste-amfitrió sobre les molècules de Prolinker; bloqueig de la superfície amb BSA.

Aquesta estratègia proporciona *a priori* una metodologia fàcil i ràpida d'immobilització dels anticòs en l'orientació correcta sense necessitat d'activació química prèvia de la monocapa o de la biomolècula. Es tracta per tant, d'un procediment senzill que consisteix en 2 únics passos: immobilització i bloqueig de la superfície tot evitant-ne el risc d'alterar l'estructura de la proteïna per manipulació química podent afectar l'afinitat per l'antigen.

Els resultats obtinguts mostraren efectivament un grau d'eficiència pel que fa a la unió de l'anticòs molt alt i a una concentració d'anticòs de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 18a). Es pot observar també com la BSA interacciona sobre els espais lliures de la capa de Prolinker. En l'optimització de l'estratègia es van provar diverses concentracions d'anticòs (5, 10, 20 i 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 18b). En aquest pas, fent

passat l'anticòs en estat natiu sobre la monocapa de Prolinker, s'obtenia una elevada densitat de recobriment de la monocapa, comparada amb les que s'obtenien per a l'estratègia covalent (veure Figura 9b) o sobre proteïna G (veure figura 14c).

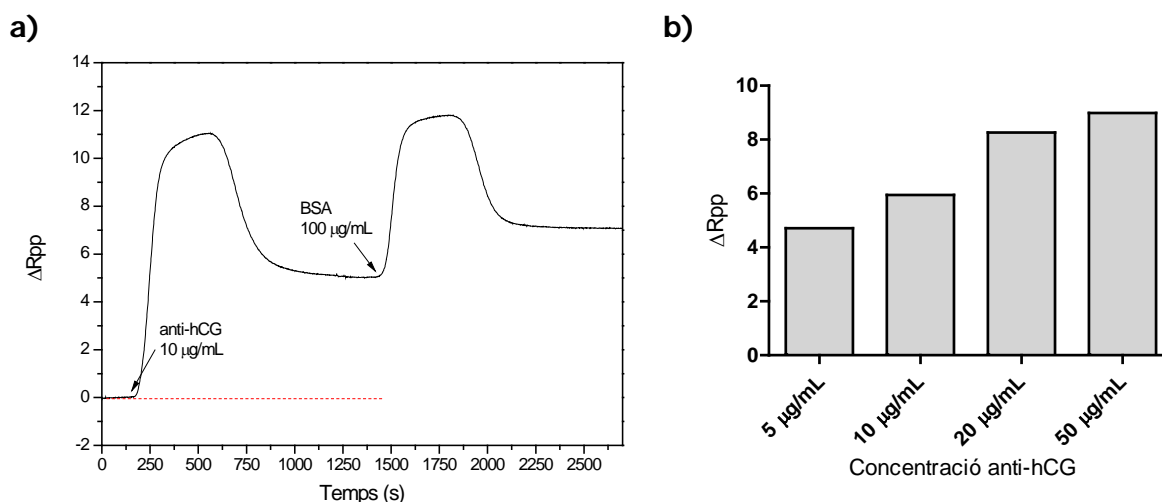


Figura 18.- Estratègia d'immobilització d'anti-hCG sobre Prolinker B. a) Sensograma del procediment d'immobilització d'anti-hCG a 10 µg/mL en PBS sobre Prolinker B, i posterior bloqueig amb BSA. b) Senyals de resposta de la immobilització per captura sobre Prolinker d'anti-hCG a diferents concentracions (5, 10, 20 i 50 µg/mL).

Es va dur a terme també una caracterització del procés d'immobilització de l'anticòs en l'estratègia Prolinker mitjançant els canvis d'angle de contacte sobre la superfície sensora. Aquest tipus de caracterització superficial es basa en l'angle que forma la superfície d'un líquid en contacte amb un sòlid. El valor de l'angle de contacte depèn principalment de la relació que existeix entre les forces adhesives del líquid i el sòlid i les forces cohesives del líquid^[50] (Figura 19).

D'aquesta manera, si el líquid per al qual mesurem l'angle de contacte és aigua, el valor de l'angle estarà directament relacionat amb la hidrofobicitat o hidrofilitat de la superfície. Si la superfície sòlida és molt hidrofílica, el líquid és fortament atret per la superfície i la gota s'expandeix, fent l'angle de contacte pròxim a 0°. Contràriament, si la superfície és hidrofòbica la gota no s'expandirà i el valor de l'angle de contacte serà elevat.

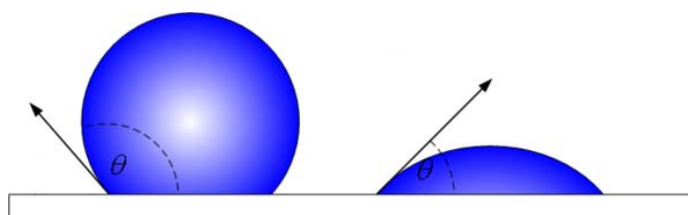


Figura 19.- Exemples d'angle de contacte d'aigua en dos tipus de superfície. A la dreta, una superfície més hidrofòbica, la gota no s'expandeix i el valor de l'angle és gran. A l'esquerra, la superfície és hidrofílica, la gota s'expandeix i el valor de l'angle de contacte és petit.

Per tal de caracteritzar la superfície sensora en cada pas de la metodologia d'immobilització sobre el Prolinker, el procediment complet es va realitzar *ex-situ*. Abans de començar la immobilització es va mesurar l'angle de contacte d'una gota de 5 µL d'H₂O sobre la superfície d'Au. Després de la

formació de la monocapa de Prolinker™ B, el xip va ser rentat i assecat amb N₂ i es va tornar a mesurar l'angle de contacte. A continuació va ser cobert amb una dissolució d'anti-hCG de 10 µg/mL durant 1 hora; es va realitzar una altra mesura, i per últim es va afegir la BSA a 100 µg/mL durant 1 hora més, i es va tornar a mesurar l'angle. Els resultats estan descrits a la taula següent:

Taula 3.- Angle de contacte de la superfície d'or en diferents etapes del procés d'immobilització per l'estratègia del Prolinker

Superfície funcionalitzada	Angle de Contacte
Au (després de la neteja)	70.6 ± 0.27
Au + Prolinker B	64.0 ± 0.20
Au + Prolinker B + anti-hCG	47.0 ± 0.16
Au + Prolinker B + anti-hCG + BSA	56.1 ± 0.21

Tal com indiquen les mesures, la superfície metàl·lica d'or presenta certa hidrofobicitat, tot i que no molt elevada (es considera una superfície hidrofòbica quan l'angle de contacte és major de 90°). En immobilitzar el Prolinker, aquesta hidrofobicitat es redueix. Això és degut a la presència dels grups metoxi i els grups amino presents en el Prolinker. Una vegada immobilitzat l'anticòs, la superfície resulta més hidrofílica a causa, principalment, dels grups funcionals (-CO₂H i NH₂) repartits per l'estructura de la immunoglobulina. No obstant, en bloquejar la superfície amb la proteïna BSA l'angle de contacte augmenta de nou, degut al lleuger caràcter hidrofòbic que té l'albumina en termes generals. Aquests estudis preliminars en angle de contacte semblen indicar una correcta immobilització en cada una de les etapes, tot i que resten pendents més experiments adreçats a caracteritzar les diferents capes de reactius en aquesta estratègia en particular.

Pel que fa a l'optimització de l'immunoassaig, un dels primers factors a estudiar fou la regeneració de la biosuperfície. Tenint en compte que el tipus de forces que uneixen l'anticòs a la monocapa de Prolinker són interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques, era d'esperar que, igual que ocorre amb l'estratègia Proteïna G, un canvi de les condicions de pH o força iònica del medi trencara les interaccions i desadsorbira l'anticòs. Tanmateix, com es pot observar a la Figura 20a, sense necessitat de cap unió covalent, la superfície podia regenerar-se eficientment després de cada immunoassaig canviant el pH del medi (neutre) a pH 3.0 (Glicina 100 mM). Amb l'objectiu d'assegurar-ne la reutilització del biosensor garantint la reproductibilitat de les mesures, es va fer un estudi del nombre de cicles de regeneració que suportaven els anticòs immobilitzats sobre la monocapa de Prolinker sense perdre eficiència en la detecció (Figura 20b). Es van comptabilitzar una mitjana de 7 cicles de detecció i regeneració amb una pèrdua de sensibilitat d'un 25% i després

la sensibilitat baixava un 70%; uns resultats habituals en immunoassajos directes on l'anticòs està immobilitzat sobre una superfície sòlida.

Es va fer també un estudi de l'especificitat de la detecció fent passar com a proteïna control l'antigen específic de pròstata (PSA) i els resultats mostren una diferència significativa de senyal (Figura 20c), la qual cosa significa que la detecció d'hCG és altament específica.

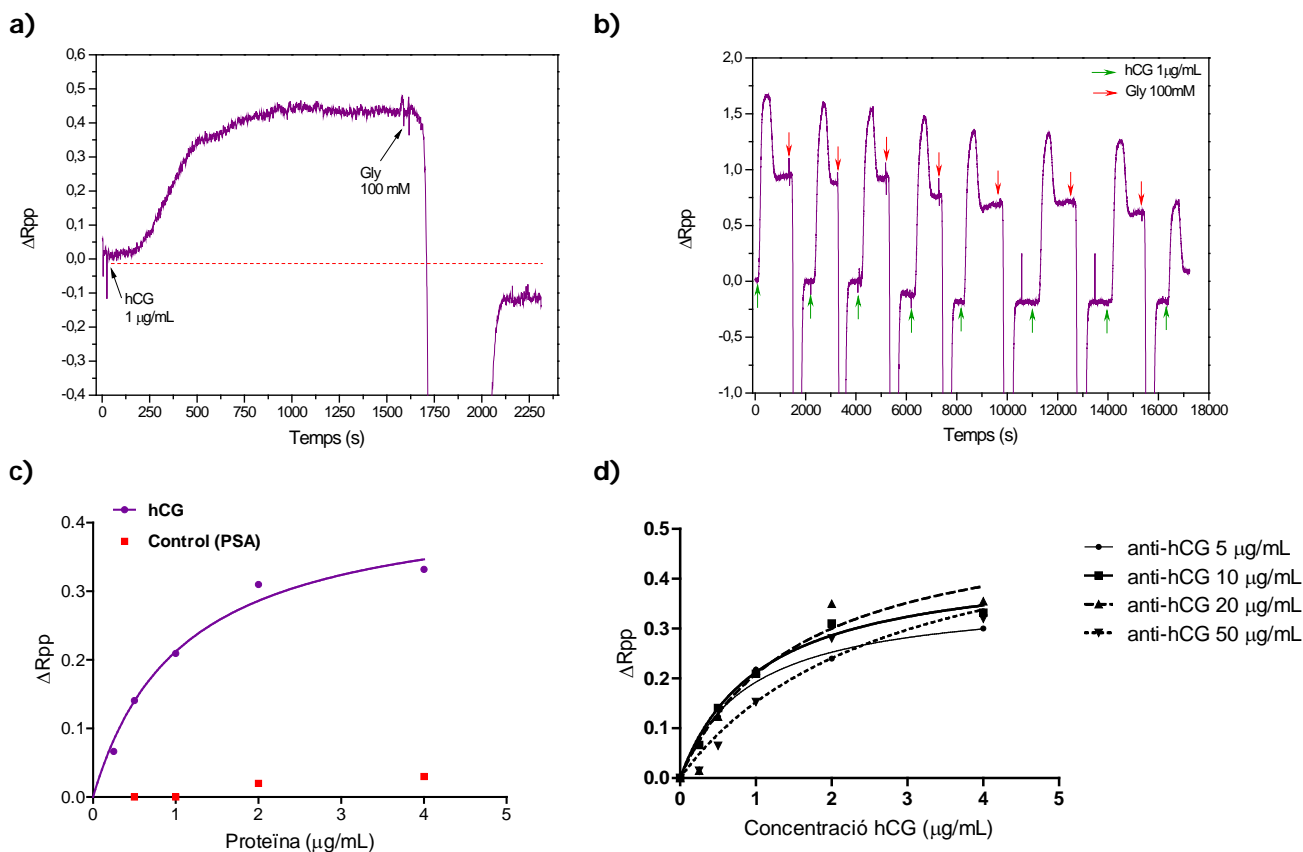


Figura 20.- Detecció d'hCG en l'estratègia Prolinker. **a)** Sensograma de la detecció d'hCG a 1 µg/mL en PBS i posterior regeneració de la superfície amb Gly 100 mM en un biosensor SPR. **b)** Sensograma dels cicles de detecció d'hCG 1 µg/mL i regeneració amb Gly 100 mM. **c)** Control d'especificitat de la detecció d'hCG en l'estratègia d'immobilització d'anti-hCG (10 µg/mL) sobre Prolinker B: corba d'unió específica d'hCG (lila), adsorció inespecífica de PSA com a proteïna control (roig). **d)** Corbes de reconeixement d'hCG a anti-hCG immobilitzat sobre Prolinker B a diferents concentracions (5, 10, 20 i 50 µg/mL).

Pel que fa a les corbes de reconeixement, es va avaluar la influència de la concentració d'anticòs immobilitzat en la detecció d'antigen. Els resultats no mostren diferències significatives en la sensibilitat de la detecció en les diferents concentracions d'anti-hCG immobilitzades (5, 10, 20 i 50 µg/mL), tal i com s'observa en la figura 20d. Es va emprar la corba amb 10 µg/mL d'anticòs immobilitzat per calcular el límit de detecció i poder comparar amb la resta d'estratègies, el qual va resultar de 0.106 µg/mL, tenint en compte l'ajust de la corba a una corba de saturació per detecció específica d'un lloc d'unió. La sensibilitat amb l'estratègia Prolinker és major que amb l'estratègia proteïna G (LOD: 0.372 µg/mL) i covalent (LOD: 0.427 µg/mL), el que demostra que la modificació

química de l'anticòs, juntament amb la correcta orientació, pot tenir una gran influència en la detecció de l'antigen en immunoassajos directes.

Els resultats de l'estratègia Prolinker indiquen una elevada eficiència en la immobilització amb senyals 1.2 vegades superiors a la immobilització sobre proteïna G i fins a 14 vegades superior a la immobilització per unió covalent de l'anticòs (Figura 20a) partint d'una concentració inicial baixa (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Pel que fa a l'orientació, es va observar com els senyals de reconeixement a diferents concentracions de proteïna eren significativament majors que amb les altres estratègies (Figura 20b), la qual cosa suposa una sensibilitat 3.5 vegades superior a la detecció en l'estratègia Proteïna G i 4 vegades superior a l'estratègia Covalent.

Aquesta major sensibilitat aconseguida amb la immobilització sobre el Prolinker s'explica principalment per l'elevada densitat de recobriment de la superfície en orientació controlada que s'aconsegueix, tenint en compte, a més, que en cap moment es modifica químicament l'estructura de l'anticòs, la qual cosa pot alterar l'afinitat per l'antigen.

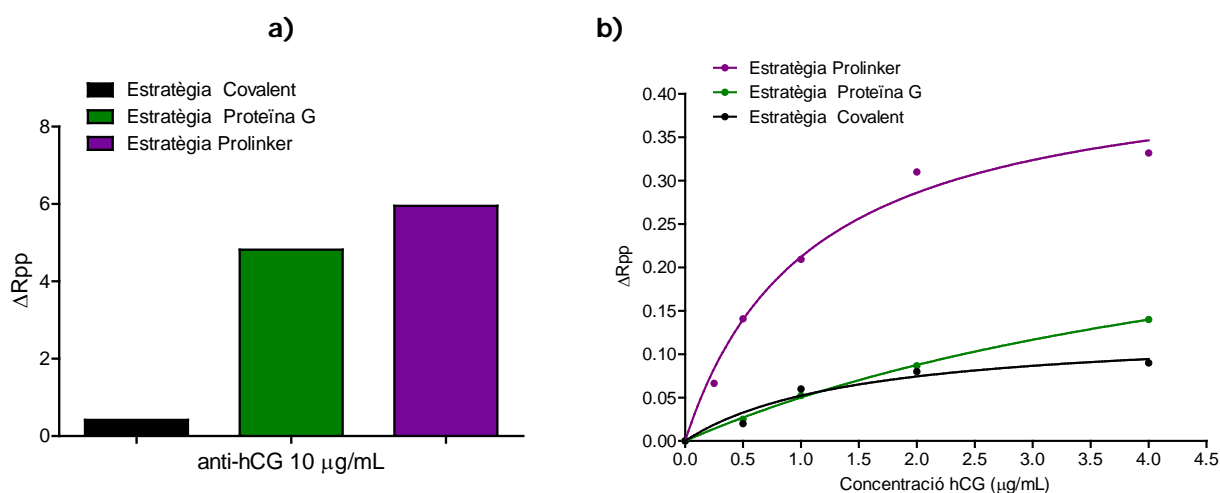


Figura 20.- Comparació de les diferents estratègies d'immobilització estudiades. a) Senyals d'immobilització de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'anti-hCG per unió covalent a una SAM d'alcanotriols (negre), per captura sobre proteïna G (verd) i per interacció amb Prolinker B (lila). **b)** Corbes de reconeixement d'hCG amb 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'anti-hCG immobilitzat per unió covalent (negre), amb proteïna G (verd) o amb Prolinker (lila).

3. Comparació de les estratègies amb altres sistemes d'interès biològic

Amb la intenció de confirmar el potencial de l'estratègia basada en l'ús del Prolinker com una metodologia genèrica apta amb altres sistemes diferents a l'escollit com a model, es van avaluar també amb altres parells antigen/anticòs. S'escolliren dues proteïnes d'interès biològic, la quinasa d'adhesió focal (FAK) i la proteïna C-reactiva (CRP). FAK és una proteïna que es troba al citosol cel·lular i està implicada en el procés d'adhesió i moviment cel·lular; té un paper important en

apoptosi i pot ser emprada com a marcador per certs càncers^[51-52]. CRP, per altra banda, es troba a la sang i els seus nivells augmenten quan hi ha una inflamació. És un marcador important per a malalties cardiovasculars^[53] i càncer^[54-55].

En primer lloc es va comprovar la reproductibilitat de les estratègies, comparant els resultats que s'obtenen tant en eficiència d'immobilització com en sensibilitat d'immunoassaig directe entre les estratègies Proteïna G i Prolinker (Figura 21). Com es preveia, la immobilització d'anticòs sobre el Prolinker resulta molt més eficient que amb la Proteïna G, tant en densitat d'immunoglobulina immobilitzada com en sensibilitat en la detecció de l'antigen.

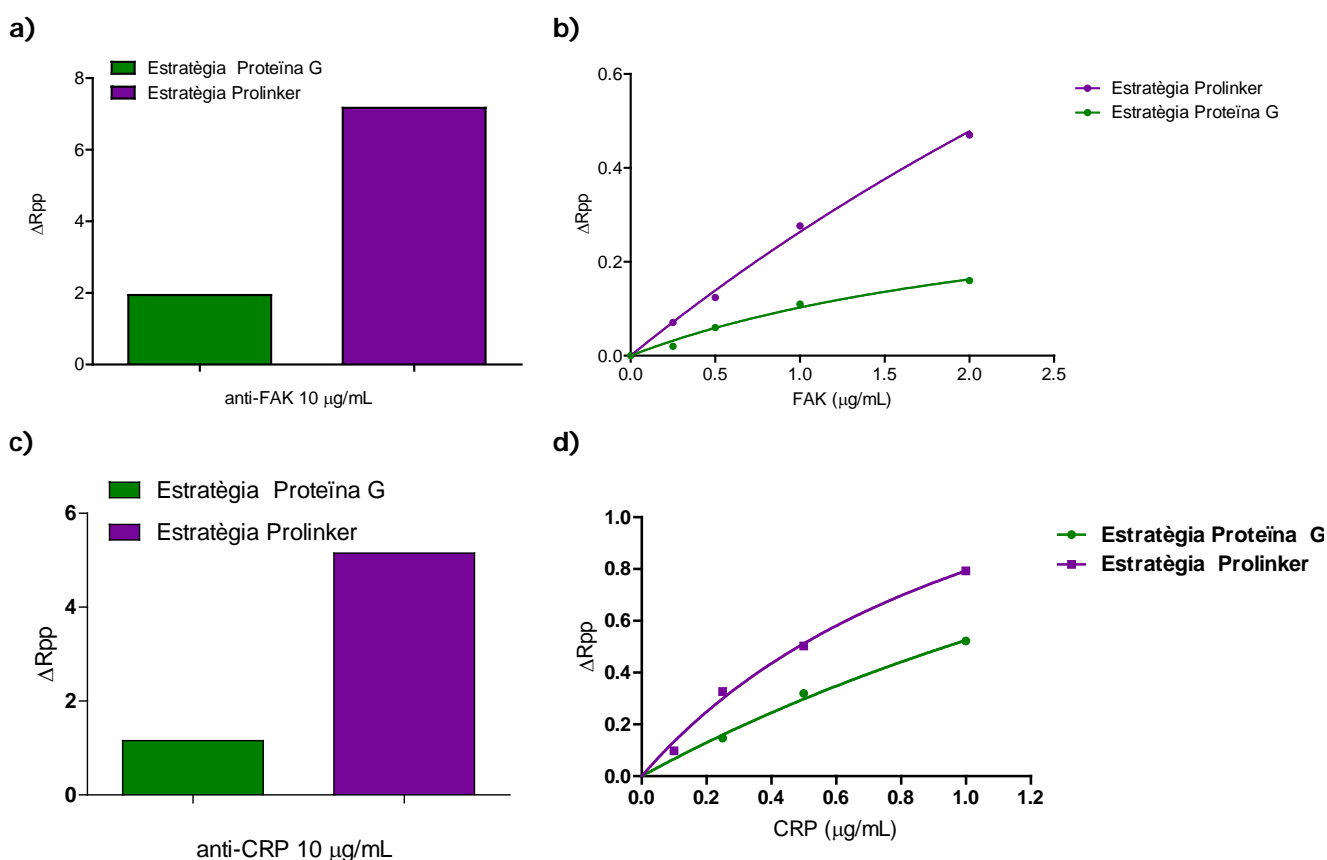


Figura 21.- Avaluació de les estratègies d'immobilització estudiades amb FAK i CRP. **a)** Senyals d'immobilització d'anti-FAK 10 $\mu\text{g/mL}$ sobre proteïna G (verd) i sobre Prolinker (lila). **b)** Corbes de reconeixement de FAK amb 10 $\mu\text{g/mL}$ d'anti-FAK immobilitzat sobre proteïna G (verd) i sobre Prolinker (lila). **c)** Senyals d'immobilització d'anti-CRP 10 $\mu\text{g/mL}$ sobre proteïna G (verd) i sobre Prolinker (lila). **d)** Corbes de reconeixement de CRP amb 10 $\mu\text{g/mL}$ d'anti-CRP immobilitzat sobre proteïna G (verd) i sobre Prolinker (lila).

Aquests resultats confirmen la validesa de l'estratègia Prolinker en diferents parells antigen/anticòs, resultant en tots els casos avaluats (hCG, FAK i CRP) la millor opció de cara a immobilitzar una major quantitat d'anticòs a concentracions relativament baixes (10 $\mu\text{g/mL}$), sense necessitat de

manipulació química prèvia del material biològic i obtenint-se una major sensibilitat en la detecció de l'antigen en format directe.

En aquests dos casos es van realitzar també corbes de calibrat per a la detecció de les dues proteïnes, ajustant-les a una corba de saturació per detecció específica d'un lloc d'unió i es va calcular el límit de detecció a partir de l'ajust lineal de les senyals de reconeixement a concentracions baixes d'antigen (Figura 22). D'aquesta manera es van obtenir límits de detecció de 97 ng/mL per a la FAK i fins a 31 ng/mL per a la CRP.

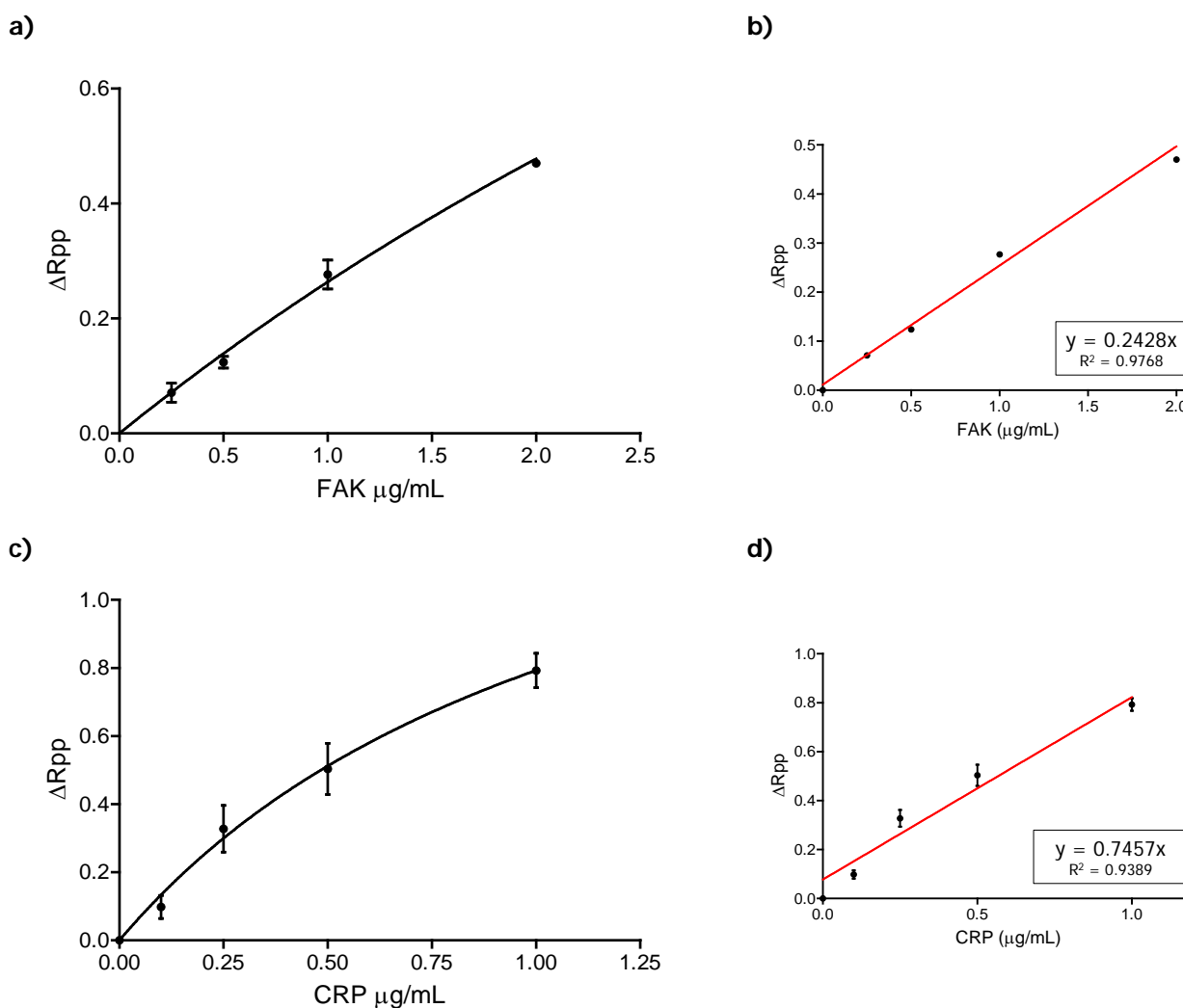


Figura 22.- Corbes de calibrat i ajustos de regressió lineal per a la detecció de FAK i CRP. a) Corba de reconeixement de FAK amb 10 µg/mL d'anti-FAK immobilitzat sobre Prolinker. **b)** Ajust per regressió lineal de la detecció de FAK. **c)** Corba de reconeixement de CRP amb 10 µg/mL d'anti-CRP immobilitzat sobre Prolinker. **d)** Ajust per regressió lineal de la detecció de CRP. Els valors corresponen a la mitjana de 3 rèpliques.

4. Prevenió i minimització d'adsorcions inespecífiques

La finalitat d'aquest estudi és trobar una metodologia d'immobilització sensible, selectiva, estable i reproducible que permeti dur a terme mesures directes en matrius complexes i de manera que siga fàcilment transferible a dispositius sensors sense marcatges. En aquest sentit, un dels majors reptes avui en dia és la reducció de l'adsorció de molècules inespecífiques a la superfície sensora en deteccions directes de mostres com sang, orina, llet o sèrum, per exemple.

S'han realitzat avenços significatius en el desenvolupament de recobriments superficials que eviten interaccions no desitjades de substàncies presents en mostres complexes^[56]. Essencialment aquestes interaccions poden provenir de proteïnes o lípids, segons el tipus de fluid. Existeixen estructures polimèriques tant d'origen natural com sintètic, amb certes propietats biocompatibles, i amb una hidrofília adient, que estan sent àmpliament emprades per reduir en la mesura del possible la unió de proteïnes a la superfície. Entre aquests polímers, destaquen l'ús del dextrà, un polisacàrid complex i ramificat format per nombroses molècules de glucosa i d'origen natural^[57-58]; el quitosà, un polisacàrid lineal d'unitats de glucosamina que és d'origen natural però s'empra modificat sintèticament^[59]; o el polietilenglicol, un polièter format per unitats d'etilenglicol àmpliament emprat en la indústria i en biomedicina^[60-61].

El polietilenglicol (PEG) (Figura 23) presenta unes propietats excel·lents tant pel que fa a la seua biocompatibilitat en medis aquosos com a la resistència que ofereix a l'adsorció proteica i cel·lular. Per altra banda i des d'un punt de vista pràctic, l'àmplia gama disponible comercialment, amb diferents grups funcionals mantenint l'esquelet d'etilenglicol, augmenta la versatilitat del compost expandint les possibilitats de funcionalització i ús^[62]. De fet, és un material d'importància creixent en bioenginyeria^[63], biomedicina i indústria farmacèutica^[64-65], biotecnologia i també per a aplicacions biosensores^[66-68].

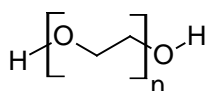


Figura 23.- Unitat de PEG

La raó d'aquesta resistència a l'adsorció de proteïnes encara no és clara, però les evidències descrites semblen indicar que s'atribueix a les forces d'estabilització estèrica i la mobilitat de les cadenes de PEG^[63, 65]. Degut a això, els compostos PEG han esdevingut molt populars en aquest àmbit, i en particular com a component clau per millorar les característiques d'immunoassajos en condicions complexes. Concretament, el seu ús es basa en actuar com a element de recobriments de superfícies biosensores millorant la selectivitat específica de l'assaig i evitant unions no desitjades.

Donat que l'estratègia d'immobilització que va oferir millors resultats en termes de sensibilitat fou l'estratègia basada en el Prolinker, es va escollir aquesta metodologia per tal d'avaluar el comportament i la resistència de la superfície funcionalitzada en medis complexos. En particular i tenint en ment un enfocament clínic, es procedí a estudiar l'efecte del sèrum.

La minimització de la reducció no específica es pot fer seguint principalment dues estratègies: per una part, bloquejant la superfície sensora amb compostos o molècules que evitarien l'adsorció d'altres substàncies, majoritàriament proteïques o lipídiques, i d'altra banda, optimitzant les condicions experimentals de mesura, variant les propietats de la dissolució amortidora emprada, per aconseguir minimitzar la interacció no específica tot mantenint inalterada la capacitat d'interacció entre l'anticòs i l'analit.

Així doncs, primer s'estudià el comportament de diversos compostos PEG (Figura 24) com a agents de bloqueig en substitució de la proteïna BSA.

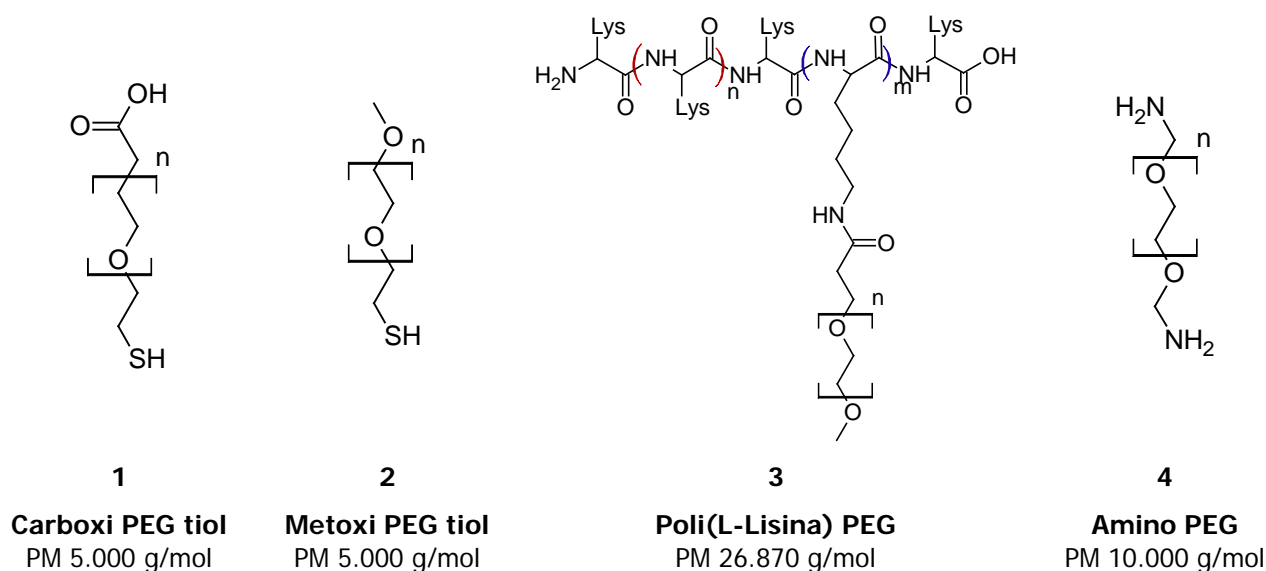


Figura 24.-Compostos PEG emprats com a agents bloquejants de la superfície

Com es pot veure a la figura, alguns d'ells contenen un grup tiol en un extrem (compost 1 i 2). El compost 1 està funcionalitzat amb un grup carboxil que dóna una hidrofilitat extra al compost, en comparació amb el compost 2 que presenta un grup metoxi capaç d'interaccionar hidrofòbica amb les proteïnes. Aquests foren emprats no tant amb la intenció de bloquejar la superfície de Prolinker com de formar una capa mixta Prolinker B/PEG resistent a unions inespecífiques i amb capacitat de mantenir l'afinitat pels anticòssos (Figura 25a).

Per altra banda, els compostos 3 i 4 contenen grups amino. Donada la capacitat del calixaré d'unir grups amina ionitzats de proteïnes, com fa amb la BSA, es va voler avaluar si compostos amb aquest grup funcional diferents a proteïnes podien també interaccionar amb el Prolinker que hagués quedat lliure després de la immobilització de l'anticòs (Figura 25b). Així, s'aconseguien dos efectes, d'una banda, protegir la superfície de calixaré d'interaccions amb grups amina d'altres proteïnes no específiques i, d'altra banda, proveir la superfície d'una capa hidrofílica repel·lira l'adsorció inespecífica.

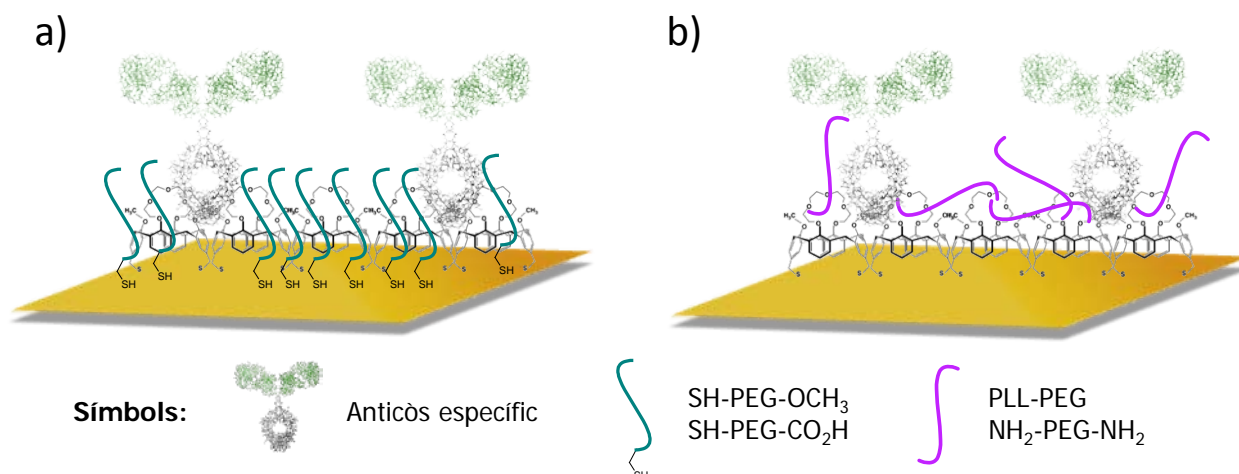


Figura 25.- Estratègies per minimitzar unions no específiques en l'estratègia Prolinker. a) Formació d'una capa mixta Prolinker B/PEG; **b)** formació d'una capa de PEG sobre la superfície de Prolinker B lliure.

Tot i que idealment, el sèrum s'ha de poder mesurar directament, inicialment en l'estudi realitzat, aquest es va injectar diluït en el solvent de mesura. Per això, a part d'avaluar la influència del PEG com a agent bloquejant, també s'ha variat la composició de la dissolució de mesura per tal de reduir al màxim les adsorpcions inespecífiques. Així, es modificà la concentració de sals alterant la força iònica de la dissolució i per tant, l'atracció electrostàtica; s'afegiren compostos bloquejants com la BSA o el dextrà, i es considerà també l'addició de surfactants com el Tween 20 (veure Taula 3), àmpliament emprat com a additiu en immunoassajos precisament per maximitzar la interacció anticòs-antigen i reduir les unions inespecífiques.

Taula 3.- Dissolucions amortidores emprades per avaluar l'efecte del sèrum diluït en l'assaig

PBS^a:	137 mM NaCl, 10 mM fosfats, 2.7 mM KCl
PBST-S:	PSB + 500 mM NaCl + 0.1% Tween 20
PBS + BSA:	PBS + 1% BSA
Matrix Buffer^[69]:	PBS + 500 mM NaCl + 0.5% Tween 20 + 200 µg/mL BSA + 500 µg/mL Dextrà

a: solució estàndard emprada en l'optimització d'estratègies

L'optimització del bloqueig superficial i les condicions de mesura es dugueren a terme combinant diferents compostos PEG amb les dissolucions tampó i analitzant l'absorció inespecífica del sèrum al 10%, com a primera aproximació abans d'intentar sèrum directament. Els resultats mostren una disminució significativa de l'adsorció en afegir a la dissolució de mesura substàncies bloquejants com la BSA o el dexrà, i s'observa també la importància de la presència de surfactant (Tween 20) per reduir la unió inespecífica (Figura 26). Es pot veure com una combinació de diversos factors (*Matrix Buffer*) pot reduir l'adsorció en un 74% respecte la dissolució de mesura estàndard (PBS). Tot i així es pot observar com no hi ha una reducció total.

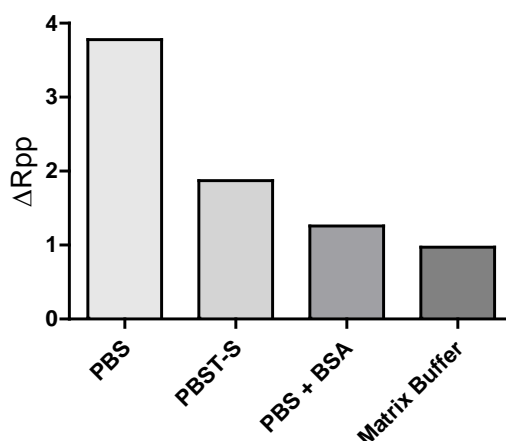


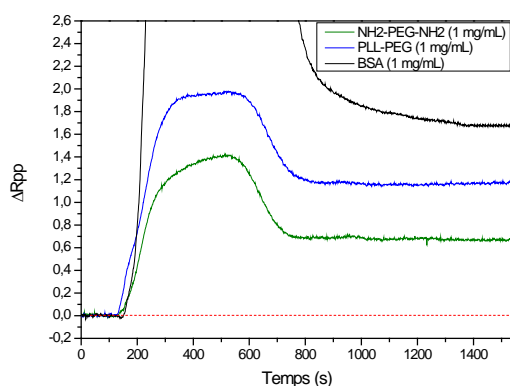
Figura 26.- Influència de la composició de la solució de mesura en l'adsorció inespecífica de sèrum diluït 1:10. Superfície funcionalitzada amb l'estratègia general de Prolinker: [Prolinker B]=3 mM, [anti-hCG]=10 µg/mL i [BSA]_{bloqueig}=100 µg/mL.

Davant aquests resultats, es va emprar aquesta dissolució de mesura (*Matrix Buffer*) per tal d'avaluar l'efecte que tenien els diferents compostos PEG com a agents bloquejants de la superfície en substitució a la BSA. Mentre que la formació de capa mixta Prolinker B/PEG no va donar bons resultats inicialment, ja que es va observar una quasi nul·la immobilització de l'anticòs probablement deguda al desplaçament de les molècules de Prolinker immobilitzades pels compostos de PEG tiolats; la capa de compostos PEG sobre el Prolinker B lliure amb els compostos 3 i 4 sí que es forma (Figura 27a), a causa de l'elevada afinitat dels grups amina ionitzats per les corones d'èter del Prolinker B. La diferència de senyals observada entre la BSA, el PLL-PEG i l'amino-PEG pot deure's a la diferència de massa molecular entre ells, ja que la BSA pesa 3 vegades més que el PLL-PEG i aquest 2 vegades més que l'amino-PEG.

Pel que fa a l'eficiència d'aquests agents bloquejants en la reducció de les unions inespecífiques, es va comparar l'adsorció inespecífica del sèrum diluït sobre les superfícies biofuncionalitzades amb BSA a 100 µg/mL (estratègia general), amb més concentració de BSA (1 mg/mL) i amb els diferents

compostos PEG estudiats (1 mg/mL). A la Figura 27b, es pot observar una clara reducció de l'adsorció no específica amb l'ús de compostos PEG en comparació a la proteïna BSA, i més encara, la formació de la capa de compostos PEG amb grups amina sobre el Prolinker B lliure resulta prometedora de cara a aconseguir la reducció total de les unions inespecífiques de mostres complexes. Tot i això, aquest estudi es troba encara en fase d'avaluació per tal d'assegurar la detecció específica de l'analit d'interès, així com de determinar la seua aplicabilitat en solucions amb una major concentració de sèrum.

a)



b)

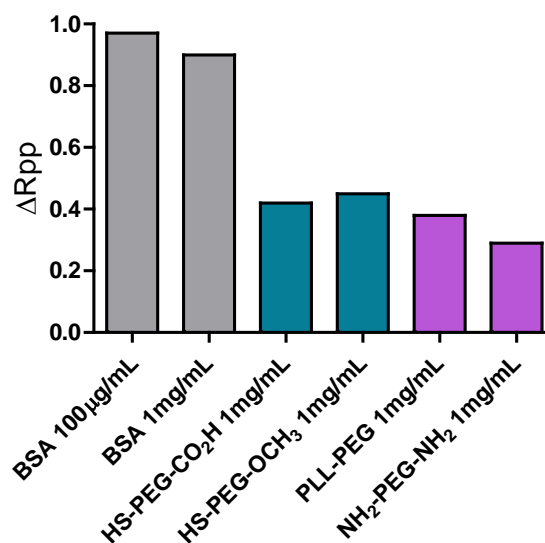


Figura 27.-a) Sensograma de la unió dels agents de bloqueig a la monocapa de Prolinker B. BSA 1 mg/mL (negre); PLL-PEG 1 mg/mL (blau); Amino-PEG 1 mg/mL (verd). **b) Influència dels compostos de bloqueig en substitució de la BSA en l'adsorció inespecífica de sèrum diluït en Matrix Buffer (1:10).** Superfície funcionalitzada amb l'estratègia Prolinker: [Prolinker B]=3 mM, [anti-hCG]=10 µg/mL.

Conclusions

L'estudi dut a terme en aquest treball demostra el gran potencial del Prolinker com a molècula orientadora en immobilització d'anticossos en comparació amb altres metodologies convencionals. L'estratègia basada en calixarens resulta en una immobilització de gran eficiència emprant concentracions d'anticòs relativament baixes en l'àmbit de biosensors que no requereixen marcatges (tipus *label-free*) (10 µg/mL). L'estratègia no requereix d'una purificació prèvia ni cap altra modificació química de la IgG. La immobilització directa i orientada de l'anticòs, a més, condueix a immunoassajos directes amb major sensibilitat. S'han assolit, d'altra banda, unes condicions de regeneració adients que trenquen la interacció anticòs-antigen sense afectar a la unió Prolinker-

anticòs, permetent la reutilització del biosensor durant 7 cicles amb bona reproductibilitat. A més, l'estratègia ha estat validada amb 3 parells antigen/anticòs d'interès biològic amb bons resultats.

S'ha avaluat l'ús de diferents additius a la dissolució amortidora de mesura i l'ús de compostos PEG com a agents de bloqueig per minimitzar l'adsorció inespecífica en l'estratègia Prolinker. S'ha demostrat que l'augment de la concentració salina, l'addició de surfactants i substàncies bloquejants en la solució de mesura redueix la unió inespecífica sobre la superfície sensora. Alhora, els compostos PEG tenen una influència clau en la reducció d'aquests efectes. En particular, els PEG aminats han donat resultats prometedors com a agents de bloqueig sobre la monocapa de Prolinker, reduint l'adsorció no específica en un 70% respecte l'ús de la BSA. Tanmateix, aquest estudi està encara en fase de desenvolupament, essent actualment els punts d'interès (i) una major reducció de les interferències procedents del sèrum per tal de poder augmentar el percentatge de fluid a injectar en el sensor (d'un 10% a un 50% o en el millor dels casos a un 100% de sèrum) i evidentment, (ii) avaluar com aquests canvis introduïts en el bloqueig i en les solucions de mesura influeixen en la detecció de l'analit i per tant en la sensibilitat final de l'assaig.

Part Experimental

1. Purificació de l'anticòs anti-hCG

a) Reactius

L'anticòs monoclonal anti-hCG va ser cedit pel Departament d'Immunologia i Oncologia del Centre Nacional de Biotecnologia (CNB-CSIC) de Madrid. La purificació es va portar a terme mitjançant una columna cromatogràfica HiTrap™ Protein G HP d'1 mL i el posterior bescanvi de dissolvent es va realitzar amb columnes d'exclusió PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare, Uppsala, Suècia). S'emprà una dissolució amortidora de fosfats salins (PBS: 137 mM NaCl, 10 mM fosfats, 2.7 mM KCl) a pH 7.0; com a eluent de l'anticòs s'emprà una dissolució 100 mM Glicina-HCl a pH 2.7 i com a dissolució neutralitzadora, 1M Tris-HCl a pH 9.0. Totes les sals i reactius emprades per a les dissolucions són de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanya).

b) Metodologia

Tant les dissolucions com la mostra es passaren a través de filtres de 0.45 µm abans d'emprar-se. Amb una xeringa connectada a la columna, s'emplenà gota a gota de dissolució amortidora evitant introduir-hi aire. La columna es rentà amb 10 volums de dissolució amortidora a 1 mL/min. Després s'aplicà la mostra (concentració recomanada 1 mg/mL) gota a gota. L'elució es dugué a terme amb 4 volums de columna de Glicina-HCl i es recolliren fraccions d'1 mL en tubs prèviament preparats

amb uns 120 µL de Tris-HCl. La concentració d'anticòs en cada fracció recollida es determinà per espectrofotometria a 280 nm amb un nanoespectrofotòmetre (IMPLEN Nanophotometer, Implen GmbH, Munic, Alemanya). A continuació les fraccions que contenien l'anticòs purificat en una barreja de Glicina i Tris, es van fer passar per una columna d'exclusió a través de la tècnica de filtració en gel i es recolliren en PBS. Es comprovà una vegada més la concentració d'anticòs en cada fracció per espectrofotometria. El rendiment de la purificació fou de 82.19%. Les fraccions amb l'anticòs purificat s'aliquotaren i s'emmagatzemaren a -20°C.

2. Estratègies d'immobilització de l'anticòs

a) Reactius

Els dissolvents per a la neteja del xip del biosensor SPR: tricloroetilè, acetona, etanol, àcid sulfúric i peròxid d'hidrogen, així com l'àcid clorhídric, l'àcid acètic i el cloroform són subministrats per Panreac, Barcelona. Les sals per fer les dissolucions amortidores, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, els reactius per a la formació de la monocapa d'alcanotols, l'àcid mercaptoundecanoïc (MUA) i el mercaptoundecanol (MUOH), els reactius d'activació, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) i el àcid 2-(N-morfolino)etanosulfònic (MES), l'etanolamina, les molècules entrecruadores, el dimetil pimelidat (DMP) i el bis(sulfosuccinimidil) suberat (BS³), l'albumina de sèrum boví (BSA), el dextrà, la glicina i el Tween 20 s'obtenen de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanya).

L'hormona gonadotropina coriònica humana (hCG) es va obtindre d'Abcam (Cambridge, Regne Unit), la quinasa d'adhesió focal (FAK) s'obtingué d'OriGene (Rockville, Estats Units) i la proteïna C-reactiva (CRP) de Scipac (Kent, Regne Unit). L'anticòs monoclonal anti-FAK es va adquirir de BD Biosciences (San José, Califòrnia, Estats Units) i l'anticòs monoclonal anti-CRP es va obtindre d'AntibodyBcn (Barcelona). La proteïna G recombinant es va adquirir de Merck (Darmstadt, Alemanya). El Prolinker B es va obtindre de Proteogen, Inc. (Seül, Corea).

Els compostos PEG tiolats (HO₂C-PEG-SH i CH₃O-PEG-SH) s'obtingueren de JenKem Technology, (Allen, Texas, Estats Units). El copolímer Poli(L-Lisina)-graft-PEG (PLL-PEG) es va adquirir de SuSoS (Dübendorf, Suïsa) i el compost de PEG aminat (NH₂-PEG-NH₂) s'obtingué de Laysan Bio (Alabama, Estats Units).

b) Metodologia

Funcionament del biosensor SPR

El biosensor SPR emprat per als experiments treballa amb la configuració de Kretschmann mitjançant el mètode de mesura consistent en registrar la intensitat de la llum reflectida mentre es manté un angle d'incidència fix. En aquest dispositiu, l'excitació del plasmó superficial es du a terme mitjançant un díode làser, model RS 194-032, que emet llum a una longitud d'ona de 670 nm amb una potència de 3 mW. Per habilitar l'ús de dos canals de mesura, el feix làser es divideix en dos feixos de la mateixa intensitat que consisteix en un cub de 5 mm de costat mitjançant el qual s'obté una separació de 3.1 mm entre els feixos. Els dos feixos es fan passar per un prisma d'acoblament òptic amb un índex de refracció $n=1.52$ a través del qual, la llum incideix en la part posterior d'una placa de vidre de 10 mm x 10 mm metal·litzada amb una capa de 2 nm de crom i 45 nm d'or (Ssens, Holanda) que es troba en contacte amb el prisma mitjançant un oli d'acoblament del mateix índex de refracció. La part metal·litzada de la placa, alhora, està en contacte amb dues cel·les de flux per les que es fa fluir les dissolucions a analitzar. Les dimensions de les cel·les de flux són de 2 mm de diàmetre i 0.1 mm de profunditat, amb una capacitat de 300 nL i separades 1 mm entre elles. Les cel·les de flux, a més, estan connectades a un sistema de distribució de fluids compost per una bomba peristàltica, una bomba d'injecció, dues vàlvules i un circuit de tubs de tefló que fan arribar les dissolucions a la superfície del sensor. En aquest treball s'empra un flux constant sobre la superfície del sensor d'aproximadament 16 $\mu\text{L}/\text{min}$ durant el procés d'immobilització i detecció, i de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ durant la regeneració de la biosuperfície. L'adquisició de la senyal es du a terme amb un fotodíode de dos quadrants. L'instrument es controla amb un software que permet controlar els sistemes de microfluídica, l'adquisició de dades i la representació de la senyal durant el transcurs de l'operació.

El procediment de neteja del xip sensor abans d'emprar-lo consisteix en successius rentats amb ultrasons en tricloroetilè, acetona, etanol i aigua. A continuació se'l submergeix en una dissolució "piranya" ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1) durant 15 segons per eliminar les possibles restes orgàniques que queden sobre la superfície d'or. Finalment, s'esbandeix amb aigua de nou i s'asseca amb una corrent de N_2 .

Estratègia Covalent

Formació de la SAM: la formació de la monocapa autoensablada es du a terme *ex-situ*, submergint el xip en una dissolució etanòlica de 12.5 μM d'àcid mercaptoundecanoïc (MUA) i 250 μM de mercaptoundecanol (MUOH) durant 12 hores. Posteriorment es rentà amb etanol, s'assecà amb N_2 i es montà en el sistema SPR.

Immobilització de l'anticòs: la biofuncionalització de la superfície sensora es realitzà de manera *in-situ* en el sensor SPR, mantenint aigua MilliQ en flux continu. En primer lloc s'activaren els grups carboxílics de la monocapa, injectant una dissolució EDC/NHS (0.2M/0.05M) en àcid 2-(N-morfolino)etanosulfònic (MES) a pH 4.7. A continuació es va fer passar la dissolució d'anticòs (10, 20 µg/mL) en PBS i finalment s'injectà etanolamina 1M per passivar els grups carboxílics activats que no hagueren reaccionat amb l'anticòs.

Immunoassaig: la detecció de l'anàlit d'interès es duqué a terme en PBS en flux continu i injectant la proteïna específica diluïda en PBS a diferents concentracions. La variació en el senyal (intensitat de la llum reflectida) és directament proporcional a la concentració de l'antigen. La regeneració de la biosuperfície es duqué a terme amb HCl 5 mM.

Estratègia Proteïna G

Formació de la SAM: veure apartat anterior.

Immobilització de l'anticòs: la unió de la proteïna G es realitzà en les mateixes condicions que l'estratègia covalent. S'inicià amb l'activació dels grups carboxílics a través de la reacció de l'EDC/NHS, a continuació s'injectà la proteïna G a diferents concentracions (20, 50, 80, 100 µg/mL) en PBS i es passivà la monocapa amb etanolamina 1M. Llavors, s'injectà l'anticòs (10, 20 µg/mL) en una dissolució tampó d'acetat a pH 5. Un cop immobilitzat l'anticòs sobre la proteïna G s'addicionà BS³ a una concentració 1000 vegades superior a l'addicionada d'anticòs per estabilitzar covalentment la unió proteïna G-anticòs.

Immunoassaig: veure apartat anterior.

Estratègia Prolinker

Formació de la SAM: s'incubà la superfície d'or amb una dissolució 3 mM de Prolinker B en CH₃Cl durant 1 hora. Després es realitzaren rentats successius amb CH₃Cl, acetona, etanol i aigua, s'assecà amb N₂. El xip s'acoblà a la cel·la de microfluidica del dispositiu SPR per continuar la funcionalització *in-situ*.

En l'estudi de minimització de l'absorció no específica es va dissoldre, juntament amb el Prolinker B, els compostos PEG (HO₂C-PEG-SH o CH₃O-PEG-SH) a una concentració de 0.25 mg/mL en CH₃Cl.

Immobilització de l'anticòs: mantenint aigua MilliQ en flux continu, es va injectar la dissolució d'anticòs (5, 10, 20, 50 µg/mL) en PBS fins a obtenir una línia base estable. Tot seguit es realitzà el bloqueig de superfície amb BSA 100 µg/mL dissolta en PBS.

En l'estudi de minimització de l'absorció no específica es va substituir la BSA de l'últim pas pels compostos PEG (PLL-PEG i NH₂-PEG-NH₂) per separat a una concentració d'1 mg/mL.

Immunoassaig: la detecció de l'anàlit d'interès es dugué a terme en PBS en flux continu i injectant la proteïna específica diluïda en PBS a diferents concentracions. La regeneració de la biosuperfície es dugué a terme amb Glicina-HCl 100 mM a pH 2.7.

Bibliografia

1. Gorton, L., ed. *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques. Comprehensive Analytical Chemistry* ed. E.S. BV. 2005: Amsterdam (The Netherlands).
2. Soper, S.A., et al., *Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006. **21**(10): p. 1932-1942.
3. Teles, F.S.R.R., *Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: A review*. *Analytica Chimica Acta*, 2011. **687**(1): p. 28-42.
4. Mohammed, M.-I. and M.P.Y. Desmulliez, *Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review*. *Lab on a Chip*, 2011. **11**(4): p. 569-595.
5. von Lode, P., *Point-of-care immunotesting: Approaching the analytical performance of central laboratory methods*. *Clinical Biochemistry*, 2005. **38**(7): p. 591-606.
6. Grieshaber, D., et al., *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. *Sensors*, 2008. **8**(3): p. 1400-1458.
7. Borisov, S.M. and O.S. Wolfbeis, *Optical Biosensors*. *Chemical Reviews*, 2008. **108**(2): p. 423-461.
8. Ngeh-Ngwainbi, J., A.A. Suleiman, and G.G. Guilbault, *Piezoelectric crystal biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 1990. **5**(1): p. 13-26.
9. Carrascosa, L.G., et al., *Nanomechanical biosensors: a new sensing tool*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2006. **25**(3): p. 196-206.
10. Ligler, F.S., *Perspective on Optical Biosensors and Integrated Sensor Systems*. *Analytical Chemistry*, 2008. **81**(2): p. 519-526.
11. Homola, J., *Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species*. *Chemical Reviews*, 2008. **108**(2): p. 462-493.
12. Liedberg, B., C. Nylander, and I. Lundstrom, *Surface-Plasmon Resonance for Gas-Detection and Biosensing*. *Sensors and Actuators B*, 1983. **4**: p. 299-304.
13. Vangent, J., et al., *OPTIMIZATION OF A CHEMOOPTICAL SURFACE-PLASMON RESONANCE BASED SENSOR*. *Applied Optics*, 1990. **29**(19): p. 2843-2849.
14. Brockman, J.M. and S.M. Fernandez, *Grating-coupled surface plasmon resonance for rapid, label-free, array-based sensing*. *American Laboratory*, 2001. **33**(12): p. 37-+.
15. Kretschmann, E.a.H.R., *Plasma resonance emission in solids*. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie*, 1968. **A 23**: p. 615.
16. Newcombe, C. and A.R. Newcombe, *Antibody production: Polyclonal-derived biotherapeutics*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2007. **848**(1): p. 2-7.
17. Marx, U. and W. Merz, *In vivo and in vitro production of monoclonal antibodies*, in *Methods in Molecular Biology; Monoclonal antibody protocols*, W.C. Davis, Editor. 1995. p. 169-176.
18. Schirrmann, T., et al., *Production systems for recombinant antibodies*. *Frontiers in Bioscience*, 2008. **13**: p. 4576-4594.
19. Wong, L.S., F. Khan, and J. Micklefield, *Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications*. *Chemical Reviews*, 2009. **109**(9): p. 4025-4053.

20. Jung, Y., J.Y. Jeong, and B.H. Chung, *Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports*. *Analyst*, 2008. **133**(6): p. 697-701.
21. Pavlickova, P., E.M. Schneider, and H. Hug, *Advances in recombinant antibody microarrays*. *Clinica Chimica Acta*, 2004. **343**(1-2): p. 17-35.
22. Butler, J.E., et al., *The immunochemistry of sandwich ELISAs: VI. Greater than 90 percent of monoclonal and 75 percent of polyclonal anti-fluorescyl capture antibodies (CAbs) are denatured by passive adsorption*. *Molecular Immunology*, 1993. **30**(13): p. 1165-1175.
23. Vega, R.A., et al., *Functional antibody arrays through metal ion-affinity templates*. *Chembiochem*, 2006. **7**(11): p. 1653-+.
24. Muir, B.W., et al., *High-throughput optimization of surfaces for antibody immobilization using metal complexes*. *Analytical Biochemistry*, 2007. **363**(1): p. 97-107.
25. Wink, T., et al., *Self-assembled Monolayers for Biosensors*. *Analyst*, 1997. **122**(4): p. 43R-50R.
26. Williams, R.A. and H.W. Blanch, *Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications*. *Biosensors and Bioelectronics*, 1994. **9**(2): p. 159-167.
27. Franco, E.J., H. Hofstetter, and O. Hofstetter, *A comparative evaluation of random and site-specific immobilization techniques for the preparation of antibody-based chiral stationary phases*. *Journal of Separation Science*, 2006. **29**(10): p. 1458-1469.
28. Neves-Petersen, M.T., et al., *Photonic activation of disulfide bridges achieves oriented protein immobilization on biosensor surfaces*. *Protein Science*, 2006. **15**(2): p. 343-351.
29. Kim, B.Y., et al., *Direct immobilization of Fab' in nanocapillaries for manipulating mass-limited samples*. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. **129**(24): p. 7620-7626.
30. Vikholm-Lundin, I. and W.M. Albers, *Site-directed immobilisation of antibody fragments for detection of C-reactive protein*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2006. **21**(7): p. 1141-1148.
31. Cho, I.-H., et al., *Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization of solid surfaces*. *Analytical Biochemistry*, 2007. **365**(1): p. 14-23.
32. Busse, S., et al., *Sensitivity studies for specific binding reactions using the biotin/streptavidin system by evanescent optical methods*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2002. **17**(8): p. 704-710.
33. Lee, Y., et al., *ProteoChip: A highly sensitive protein microarray prepared by a novel method of protein immobilization for application of protein-protein interaction studies*. *PROTEOMICS*, 2003. **3**(12): p. 2289-2304.
34. McDonnell, J.M., *Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001. **5**(5): p. 572-577.
35. Spinke, J., et al., *Molecular recognition at self-assembled monolayers: the construction of multicomponent multilayers*. *Langmuir*, 1993. **9**(7): p. 1821-1825.
36. Spinke, J., et al., *MOLECULAR RECOGNITION AT SELF-ASSEMBLED MONOLAYERS - OPTIMIZATION OF SURFACE FUNCTIONALIZATION*. *Journal of Chemical Physics*, 1993. **99**(9): p. 7012-7019.
37. Munoz, E.M., et al., *Direct surface plasmon resonance immunosensor for in situ detection of benzoylecgonine, the major cocaine metabolite*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(11): p. 4423-4428.
38. Dostálek, J., et al., *Surface plasmon resonance biosensor based on integrated optical waveguide*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2001. **76**(1-3): p. 8-12.
39. L. Rydén, J.J., ed. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*. 1998: Wiley, New York.
40. Biotech, A.P., ed. *Antibody Purification Handbook*. 2000: Uppsala.
41. Ey, P.L., S.J. Prowse, and C.R. Jenkin, *Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose*. *Immunochemistry*, 1978. **15**(7): p. 429-436.
42. Proudfoot, K.A., et al., *Purification of recombinant chimeric B72.3 Fab' and F(ab')₂ using streptococcal protein G*. *Protein Expression and Purification*, 1992. **3**(5): p. 368-373.
43. Urh, M., D. Simpson, and K. Zhao, *Chapter 26 Affinity Chromatography: General Methods*, in *Methods in Enzymology*, R.B. Richard and P.D. Murray, Editors. 2009, Academic Press. p. 417-438.
44. Oh, B.-K., et al., *Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhimurium*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004. **19**(11): p. 1497-1504.

45. Jyoung, J.-Y., et al., *Immunosensor for the detection of Vibrio cholerae O1 using surface plasmon resonance*. Biosensors and Bioelectronics, 2006. **21**(12): p. 2315-2319.
46. Quinn, J., et al., *The use of regenerable, affinity ligand-based surfaces for immunosensor applications*. Biosensors and Bioelectronics, 1999. **14**(6): p. 587-595.
47. Newcombe, A.R., et al., *Evaluation of a biosensor assay to quantify polyclonal IgG in ovine serum used for the production of biotherapeutic antibody fragments*. Process Biochemistry, 2006. **41**(4): p. 842-847.
48. Bergström, G. and C.-F. Mandenius, *Orientation and capturing of antibody affinity ligands: Applications to surface plasmon resonance biochips*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011. **158**(1): p. 265-270.
49. Oh, S.W., et al., *Calixarene derivative as a tool for highly sensitive detection and oriented immobilization of proteins in a microarray format through noncovalent molecular interaction*. The FASEB Journal, 2005. **19**(10): p. 1335-1337.
50. Kwok, D.Y., et al., *Measuring and interpreting contact angles: a complex issue*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1998. **142**(2-3): p. 219-235.
51. van Nimwegen, M.J. and B. van de Water, *Focal adhesion kinase: A potential target in cancer therapy*. Biochemical Pharmacology, 2007. **73**(5): p. 597-609.
52. Zebda, N., O. Dubrovskiy, and K.G. Birukov, *Focal Adhesion Kinase Regulation of Mechanotransduction and its Impact on Endothelial Cell Functions*. Microvascular Research, 2012. **83**(1): p. 71-81.
53. Schillaci, G. and M. Pirro, *C-reactive protein in hypertension: clinical significance and predictive value*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2006. **16**(7): p. 500-508.
54. Groblewska, M., et al., *Interleukin 6 and C-reactive protein in esophageal cancer*. Clinica Chimica Acta, 2012. **413**(19-20): p. 1583-1590.
55. Wethal, T., et al., *C-reactive protein; a potential marker of second cancer and cardiovascular disease in testicular cancer survivors?* European Journal of Cancer, 2010. **46**(18): p. 3425-3433.
56. Krishnan, S., C.J. Weinman, and C.K. Ober, *Advances in polymers for anti-biofouling surfaces*. Journal of Materials Chemistry, 2008. **18**(29): p. 3405-3413.
57. McLean, K.M., et al., *Method of immobilization of carboxymethyl-dextran affects resistance to tissue and cell colonization*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2000. **18**(3-4): p. 221-234.
58. Piehler, J., et al., *Protein interactions in covalently attached dextran layers*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1999. **13**(6): p. 325-336.
59. Zhou, Y., et al., *Chitosan-N-poly(ethylene oxide) brush polymers for reduced nonspecific protein adsorption*. Journal of Colloid and Interface Science, 2007. **305**(1): p. 62-71.
60. Zalipsky, S. and J.M. Harris, *Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol)*, in *Poly(ethylene glycol)*. 1997, American Chemical Society. p. 1-13.
61. Gombotz, W.R., et al., *Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces*. Journal of Biomedical Materials Research, 1991. **25**(12): p. 1547-1562.
62. Österberg, E., et al., *Comparison of polysaccharide and poly(ethylene glycol) coatings for reduction of protein adsorption on polystyrene surfaces*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1993. **77**(2): p. 159-169.
63. Li, J. and W.J. Kao, *Synthesis of Polyethylene Glycol (PEG) Derivatives and PEGylated Peptide Biopolymer Conjugates*. Biomacromolecules, 2003. **4**(4): p. 1055-1067.
64. Otsuka, H., Y. Nagasaki, and K. Kataoka, *PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**(3): p. 403-419.
65. Michel, R., et al., *Influence of PEG Architecture on Protein Adsorption and Conformation*. Langmuir, 2005. **21**(26): p. 12327-12332.
66. Wagner, V.E., J.T. Koberstein, and J.D. Bryers, *Protein and bacterial fouling characteristics of peptide and antibody decorated surfaces of PEG-poly(acrylic acid) co-polymers*. Biomaterials, 2004. **25**(12): p. 2247-2263.
67. Kannan, B., et al., *Lithographic techniques and surface chemistries for the fabrication of PEG-passivated protein microarrays*. Biosensors and Bioelectronics, 2006. **21**(10): p. 1960-1967.

68. Zhang, Y., Y. Chen, and G. Jin, *Serum tumor marker detection on PEGylated lipid membrane using biosensor based on total internal reflection imaging ellipsometry*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **159**(1): p. 121-125.
69. Uludağ, Y. and I.E. Tohill, *Development of a sensitive detection method of cancer biomarkers in human serum (75%) using a quartz crystal microbalance sensor and nanoparticles amplification system*. *Talanta*, 2010. **82**(1): p. 277-282.