

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Implementación de plataformas biosensoras ópticas basadas en nuevos
elementos de reconocimiento selectivo para la monitorización de
inmunosupresores en muestras sanguíneas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ana Bettina Glahn Martínez

DIRECTORAS

María Cruz Moreno Bondi

Elena Benito Peña

Madrid, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOMEDICINA**



**IMPLEMENTACIÓN DE PLATAFORMAS BIOSENSORAS
ÓPTICAS BASADAS EN NUEVOS ELEMENTOS DE
RECONOCIMIENTO SELECTIVO PARA LA
MONITORIZACIÓN DE INMUNOSUPRESORES EN
MUESTRAS SANGUÍNEAS**

Directoras:

Dr. María Cruz Moreno Bondi
Catedrática de universidad

Dr. Elena Benito Peña
Profesora Titular

**TESIS DOCTORAL QUE PRESENTA
ANA BETTINA GLAHN MARTÍNEZ**

Madrid, 2022

Agradecimientos

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento a mis directoras de Tesis: la Prof. María Cruz Moreno Bondi por su experiencia, su continua supervisión y discusión de los resultados, contagiándome el perfeccionismo en el trabajo; a la Prof. Elena Benito Peña por inculcarme su pasión y vocación por la ciencia, por sus consejos y apoyo, por sus grandes ideas y por guiarme durante las diferentes etapas de mi formación. Las dos apostaron por mí y me enseñaron de lo que soy capaz, gracias por su incansable e incondicional ayuda durante estos años.

Agradecer la acogida que recibí en los diferentes grupos de investigación en los que tuve, durante el transcurso de mi Tesis, la oportunidad de realizar estancias predoctorales: a los grupos del Prof. Günter Gauglitz (Universidad Eberhard Karls de Tübingen), del Prof. José Guisan (Instituto de Catálisis y Petroquímica, CSIC, Madrid) y del Prof. Alberto Escarpa (Universidad de Alcalá de Henares).

A todas las personas con las que durante estos años he podido colaborar y me ayudaron en la realización de las diferentes investigaciones: Dra. Katrin Freudenberger (EKUT, Tübingen), Dr. Urs Hilbig (EKUT, Tübingen), Prof. Ana Belén Descalzo, Dra. Francesca Salis, Dr. Rodrigo Barderas (ISCIII, Madrid), Giacomo Lucchesi (UNIFI, Florencia), Prof. Gabriella Caminati (UNIFI, Florencia), Prof. Ángeles Canales, Dra. Ana Isabel Manzano, Dr. Beatriz Jurado Sánchez (UAH, Madrid).

Los trabajos de investigación recogidos en esta Tesis fueron financiados por el proyecto europeo “NANODEM” (FP7-318372), el MINECO (CTQ2015-69278-C2) y el MICINN (RTI2018-096410-B-C21). También me gustaría agradecer a la UCM por la concesión de un contrato predoctoral de personal investigador en formación.

Asimismo, he de agradecer al grupo de investigación GSOLFA y al director del grupo el Prof. Guillermo Orellana, por sus aportaciones en los diferentes trabajos, a su disponibilidad para ayudarme con las dudas científicas y aportar un punto de vista diferente en las reuniones de grupo. A todos los miembros del grupo que he conocido durante todos estos años. A Álvaro, porque con el tiempo comenzamos a congeniar más y a desahogarnos el uno con el otro. A Riikka por su ayuda con los problemas que había a la parte “bio” y a revisión de textos en inglés. A Fernando por el ambiente en el laboratorio,

a JoseQ por la alegría que le acompaña. A Maxi por estar siempre dispuesto a ayudar con los problemas logísticos. Y entre a otros muchos a Lidia, Mar, Paco, Luis, Jose Ángel Francesca. A Nuria y a Bea por su incalculable ayuda con algunos papeleos. A los alumnos que han pasado por el laboratorio. A Sonia con la que no llegué a compartir tiempo en el laboratorio pero sí fuera de él, gracias por tus consejos y ánimos.

A todos aquellos que hicieron que las estancias fueran más llevaderas. A Katrin, Urs, Julia, Patricia y Johanna en las dos estancias en la EKUT. A Alejandro, Lara y Javier del Instituto de Catálisis y Petroquímica. A todos los del 2L2 en Alcalá, hicisteis que no me importara tanto la excursión diaria y me sentí como una más desde el primer momento, en especial a Carmen, Javi y JuanFran.

A mis *Nornas*, Sara y Laura, por todos esos momentos con vosotras de conciertos, de aventuras por tierras lejanas o simplemente frente a una taza de café. Porque me completáis de una forma única. A Clara, Sandra, Belén, Vane, Raquel, Cris y Patri, por el tiempo que hemos pasado en la uni y fuera de ella; y aunque ahora no nos veamos tanto (en algunos casos los km no ayudan), cuando lo hacemos parece que no pasó el tiempo.

A esos amigos que la vida te pone en el camino sin imaginarlo: Sergio, Alberto y Laura, al empezar en el laboratorio nunca imaginé que pudiera conocer gente tan increíble como vosotros. Por presentarme a Alberto, Nati y Danny y Ana, por todas esas noches hablando de mil cosas entre risas y esos momentos importantes que hemos pasado juntos.

A David por su paciencia y apoyo en los momentos más críticos de esta tesis. A Lorena, Juanjo y Miguel, los cuales me acogieron como a una más y me inculcaron su pasión por los juegos de mesa.

Por último quiero dar las gracias a mi familia, por su apoyo en todo momento. En especial a mis padres, por estar siempre ahí, por impulsarme y darme alas para que lograra todo lo que me propusiera. Por aguantar mi desesperación y no dejar que me rindiera. Sin olvidarme de Daniela, la pequeña bicho palo, que siempre estaba dispuesta a aporrear el teclado para ayudarme a escribir.

ÍNDICE

I. Summary	9
II. Resumen.....	15
III. Abreviaturas y símbolos.....	21
IV. Introducción general	31
1. Terapia inmunosupresora.....	33
1.1. Mecanismos generales de acción	33
1.1.1. Glucocorticoides.....	33
1.1.2. Moduladores de inmunofilinas.....	34
1.1.3. Citostáticos.....	35
1.1.4. Inmunosupresores biológicos.....	36
1.1.5. Otros inmunosupresores	37
1.2. Usos y aplicaciones	37
1.2.1. Trasplantes	37
1.2.2. Enfermedades autoinmunes	41
1.3. Inmunosupresores usados en trasplantes	41
1.3.1. Ácido micofenólico	42
1.3.2. Tacrolimus	44
1.3.3. Ciclosporina A	45
1.3.4. Sirolimus	47
1.4. Monitorización terapéutica para el control de la inmunosupresión farmacológica	48
1.4.1. Farmacocinética y farmacodinámica	50
1.4.2. Tiempo de monitorización en el TDM.....	52
2. Biosensores y bioensayos.....	54
2.1. Biosensores	54
2.1.1. Consideraciones generales: definición y clasificación	54
2.1.2. Biosensores ópticos.....	58
2.2. Retos en la detección de moléculas con bajo peso molecular	63
3. Métodos analíticos para la determinación de inmunosupresores.....	65
3.1. Tratamiento de muestras: métodos de extracción, purificación y preconcentración.....	65
3.2. Métodos cromatográficos	69
3.2.1. Cromatografía líquida	69
3.2.2. Cromatografía de gases	73
3.3. Métodos no cromatográficos.....	77
3.3.1. Inmunoensayos.....	77
3.3.1.1. Anticuerpos.....	77
3.3.1.2. Clasificación	81
3.4. Características analíticas	82
3.5. Otros métodos	97

V. Objetivos generales	103
VI. Desarrollo de un inmunoensayo basado en medidas de polarización de fluorescencia para la detección de inmunosupresores en suero sanguíneo.....	107
1. Introducción	109
1.1. Polarización de fluorescencia	109
1.2. Marcadores fluorescentes alternativos a fluoresceína para FPIA.....	111
2. Objetivos	116
3. Materiales y métodos	117
3.1. Reactivos y disoluciones.....	117
3.2. Instrumentación.....	119
3.2.1. Lector de placas.....	119
3.2.2. Espectrofotómetro y fluorímetros.....	119
3.2.3. Cromatografía	119
3.2.4. Otros instrumentos y materiales	120
3.3. Síntesis de los colorantes fluorescentes.....	120
3.3.1. Derivados de ISDs marcados con la molécula fluorescente AO	120
3.3.2. Derivado fluorescente del MPA marcado con LY	121
3.4. Cálculo del rendimiento cuántico de fluorescencia	123
3.5. Protocolo de ensayo	123
3.6. Preparación de la muestra.....	125
3.7. Análisis de muestras de suero	125
3.8. Análisis de muestra real	126
4. Resultados y discusión	127
4.1. Purificación de MPA-LY	127
4.2. Caracterización espectroscópica de los inmunosupresores marcados con una sonda fluorescente	128
4.2.1. Caracterización fotoquímica	128
4.2.2. Ensayos de interacción de los conjugados de MPA con albúmina de suero humano.....	131
4.3. Optimización de la concentración de los inmunoreactivos.....	132
4.4. Efecto de la composición de la disolución amortiguadora	136
4.5. Optimización del tiempo de incubación	138
4.6. Pretratamiento de los pocillos con una solución de bloqueo	139
4.7. Caracterización analítica	140
4.8. Selección del tratamiento de muestra	143
4.9. Efecto matriz en muestras biológicas.....	144
4.10. Estudios de recuperación en muestras salpicadas de suero y sangre	145
4.11. Aplicación en el análisis de muestras de plasma reales	146
5. Conclusiones	147

VII. Síntesis de proteínas recombinantes fluorescentes para la detección de fk506	149
1. Introducción	151
1.1. Proteínas de unión al FK506	152
1.2. Marcaje de proteínas mediante sustancias luminiscentes	153
1.2.1. Marcaje químico de proteínas empleando sondas fluorescentes	154
1.2.2. Marcaje de proteínas mediante modificación genética	156
1.2.3. Marcaje enzimático de proteínas	158
1.2.4. Etiquetado con nanopartículas	159
1.3. Proteínas fluorescentes	159
1.4. Micromotores.....	163
1.4.1. Métodos de propulsión	165
1.4.1.1. Micromotores alimentados químicamente (catalíticos).....	165
1.4.1.2. Micromotores alimentados por fuentes de propulsión externa.....	167
1.4.1.3. Híbridos	168
1.4.2. Fabricación de motores	168
2. Objetivos	172
3. Materiales y métodos	173
3.1. Síntesis y expresión de proteínas fluorescentes	173
3.1.1. Reactivos	173
3.1.2. Disoluciones y agentes bloqueantes	174
3.1.3. Microorganismos	174
3.1.4. Vectores	174
3.1.5. Cebadores	175
3.1.6. Medios de cultivo	175
3.1.7. Instrumentación.....	175
3.1.8. Producción de las proteínas recombinantes FKBP-FP	176
3.1.8.1. Construcción de los plásmidos pFKBP1A-FP	176
3.1.8.2. Transformación de la cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	180
3.1.8.3. Expresión de las proteínas de fusión en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	180
3.1.8.4. Aislamiento y purificación	180
3.1.9. Caracterización molecular.....	181
3.1.9.1. Determinación de la concentración de proteína	181
3.1.9.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	182
3.1.9.3. Tinción con Coomassie.....	182
3.1.9.4. Microbalanza de cristal de cuarzo	182
3.2. Aplicación de las proteínas de fusión fluorescentes al desarrollo de bioensayos empleando partículas magnéticas.....	185
3.2.1. Reactivos.....	185
3.2.2. Disoluciones y agentes bloqueantes.....	185

3.2.3. Instrumentación	186
3.2.4. Aplicación de las proteínas de fusión fluorescentes al desarrollo de bioensayos empleando partículas magnéticas	186
3.2.4.1. Inmovilización del FK506 sobre la superficie de partículas magnéticas	186
3.2.4.2. Protocolo de ensayo empleando MB-FK506 y las proteínas FKBP1A-FP	187
3.2.4.3. Análisis de muestras reales	189
3.3. Aplicación de las proteínas de fusión fluorescentes al desarrollo de bioensayos empleando micromotores.....	190
3.3.1. Reactivos.....	190
3.3.2. Disoluciones y agentes bloqueantes.....	191
3.3.3. Instrumentación	191
3.3.4. Síntesis de micromotores Janus	192
3.3.5. Protocolo de ensayo empleando las partículas Janus y las proteínas FKBP1A-FP	193
4. Resultados y discusión	194
4.1. Síntesis y expresión de proteínas fluorescentes.....	194
4.1.1. Producción de proteínas recombinantes de FKBP1A fusionadas a proteínas fluorescentes	194
4.1.1.1. Clonación y secuenciación de las construcciones	194
4.1.1.2. Expresión de las proteínas recombinantes fluorescentes FKBP1A-FP en <i>E. coli</i>	195
4.1.2. Caracterización de las proteínas recombinantes fluorescentes.....	197
4.1.2.1. Caracterización espectroscópica	197
4.1.2.2. Análisis mediante microbalanza de cristal de cuarzo.....	198
4.2. Desarrollo de un bioensayo para la determinación de FK506 empleando partículas magnéticas y FKBP1A-EmGFP	206
4.2.1. Optimización de la inmovilización del FK506 sobre partículas magnéticas	206
4.2.2. Optimización del bioensayo.....	207
4.2.2.1. Evaluación de las construcciones fluorescentes	207
4.2.2.2. Selección de la concentración de proteína fluorescente y de MB-FK506	208
4.2.2.3. Selección de la disolución amortiguadora	209
4.2.2.4. Tiempo de incubación.....	210
4.2.2.5. Bloqueo de las partículas magnéticas empleadas en el ensayo.....	211
4.2.2.6. Evaluación del efecto de la temperatura	212
4.2.2.7. Caracterización analítica.....	213

4.2.2.8. Reproducibilidad de la funcionalización de las partículas magnéticas	216
4.2.2.9. Efecto matriz en muestras biológicas	216
4.2.2.10. Aplicación en el análisis de muestras reales	217
4.3. Aplicación de las proteínas de fusión fluorescentes al desarrollo de bioensayos empleando micromotores.....	219
4.3.1. Selección del tipo de micromotor	219
4.3.1.1. Micromotores tubulares	219
4.3.1.2. Micromotores esféricos	225
4.3.2. Tipo de movimiento de los micromotores.....	227
4.3.3. Selección de la cantidad de micromotores y tiempo de incubación.....	229
4.3.4. Caracterización analítica.....	230
5. Conclusiones	232
VIII. Final conclusions.....	235
IX. Conclusiones finales	243
X. Final remarks	251
XI. Consideraciones finales.....	255
XII. Referencias.....	259

I. SUMMARY

Implementation of optical biosensor platforms based on new selective recognition elements for immunosuppressant monitoring in blood samples

The demand for organ transplantation increases worldwide every year and, according to the Global Observatory on Donation and Transplantation and the World Health Organization, more than 153,800 transplants were performed in 84 countries in 2019. The success of transplantation and correct recovery of the patient depends, to a large extent, on the control of adequate levels of immunosuppressive drugs (ISDs) in blood, as they present narrow therapeutic windows and large inter- and intra-individual absorption variations (that may result in unpredictable levels). Therefore, one of the main objectives of Public Health authorities is to ensure the adequate pharmacotherapeutic monitoring of immunosuppressants in organ recipients to ensure a maximum therapeutic response with the minimum adverse effects.

Currently, liquid chromatography coupled to different detectors (*e.g.* diode array, fluorescence or mass spectrometry) is widely applied for the control of ISDs in clinical laboratories. Although all these techniques allow the development of sensitive and reproducible analytical methods, they require properly trained personnel and, in most cases, complex sample pretreatment steps that increase irreproducibility, the analysis time and the cost per assay. Furthermore, these methods are not suitable for semi-continuous monitoring in point-of-care (POC) devices or for high-throughput screening.

The development of antibody-based screening methods has received much attention from clinical laboratories and diagnostic companies for the analysis of ISDs. In contrast to chromatographic techniques, immunoassays can be easily integrated into a specialized laboratory (automation, traceability and ease of method validation), or even be part of a POC device. However, their main disadvantage is their potential cross-reactivity towards active or inactive metabolites in the sample, leading to a possible overestimation of the analyte concentration. However, these problems can be overcome by using recombinant anti-ISD antibodies or selective immunosuppressant binding bioreceptors.

The main objective of this Doctoral Thesis is the development of new biosensors for the analysis of immunosuppressants in blood samples from organ transplanted patients.

For this purpose, different assay formats and measurement strategies have been implemented, evaluating their impact on the analytical characteristics of the developed methods. New recognition elements, or fluorescent derivatives of the analytes, have been designed to achieve a more sensitive, rapid and selective detection of the selected targets, mycophenolate acid (MPA) and tacrolimus (FK506).

The first part of the Thesis describes the development of a homogeneous assay based on fluorescence polarization, where fluorescent analogues of the immunosuppressants FK506, MPA and cyclosporin A (CsA) are evaluated. Only the MPA analog provided the required selectivity for the analysis in blood samples, allowing the determination of free MPA with a limit of detection (LOD) of 0.8 ng/mL and a dynamic range of 1.7-39 ng/mL. The sensitivity obtained is excellent and fits the therapeutic requirements improving the LODs of the immunoassays described in the literature for this type of analysis. No cross-reactivity was observed in the presence of other ISDs generally administered with MPA (CsA and FK506), or against the metabolite MPA glucuronide. The optimized assay was applied to the analysis of MPA in serum from a transplant patient treated with MPA and FK506, and the results were validated by HPLC-DAD.

In the second part of the Thesis, bioassays based on luminescence measurements have been developed for the analysis of FK506. Specifically, recombinant fluorescent receptors have been designed and produced as an alternative to selective antibodies, obtained from animal models used in immunoassays. The fusion proteins contained the FKBP1A receptor, an immunophilin that forms a complex with FK506 conferring immunosuppressive capacity, and the Emerald green fluorescent protein (EmGFP) or the orange fluorescent protein (mOrange2). This approach offers the possibility of unlimited production of the recognition element, avoiding batch-to-batch variations, with a low cost. The interaction between the fluorescent recombinant receptors and the drug was evaluated using a quartz crystal microbalance (QCM).

The recombinant proteins have been applied to the development of two types of competitive heterogeneous assays. The first one employs magnetic particles functionalized with FK506. After the evaluation of the different protein constructs better

results were provided by the FKBP1A-EmGFP that was used for further experiments. The optimized bioassay fits the therapeutic requirements, showing a LOD of 3 ng/mL and a dynamic range between 5 and 70 ng/mL. No cross-reactivity was observed against MPA, although sirolimus (Sir), which has a very similar structure to FK506 and is recognized in the organism by the same receptor, is recognized as well by the recombinant protein. The new bioassay was applied to the analysis of FK506 in whole blood samples from transplant recipients, and the results compared favorably with those provided by an external laboratory.

The second method was based on the production of FK506-functionalized polycaprolactone Janus magnetic micromotors. These microparticles move autonomously in a solution, inducing an efficient fluid mixing, which accelerates the interactions of the recognition element with the functionalized micromotor and the analyte, resulting in improved analytical characteristics of the method. This assay is performed in a single step, reducing the analysis time and is based on the competition between the analyte and FK506 immobilized on the motor surface for the recognition site of the recombinant fluorescent receptor added to the sample. Compared to the magnetic particle-based assay, this assay shows a lower LOD and a larger dynamic range, although the reproducibility is slightly lower (mean RSD: 16% vs 10%). The selectivity of the assay was evaluated by measuring the competitive inhibition curve with MPA and no cross-reactivity was observed over the range of concentrations evaluated. The simplicity and analytical characteristics of this method are promising for the future determination of FK506 in biological samples.

II. RESUMEN

Implementación de plataformas biosensoras ópticas basadas en nuevos elementos de reconocimiento selectivo para la monitorización de inmunosupresores en muestras sanguíneas

Cada año aumenta la demanda de trasplantes de órganos en todo el mundo, y según los datos del Observatorio Mundial de Donación y Trasplante y de la Organización Mundial de la Salud, en 2019 se realizaron más de 153,800 intervenciones en 84 países. El éxito del trasplante y la correcta recuperación del paciente dependen, en gran parte, de que se controlen en el paciente los niveles adecuados de medicamentos inmunosupresores (ISDs) tras el trasplante, los cuales presentan ventanas terapéuticas estrechas y grandes variaciones de absorción inter e intraindividuo (dando origen a niveles impredecibles en la sangre). Por ello, uno de los objetivos fundamentales de las autoridades de la Salud Pública es la monitorización farmacoterapéutica de estos medicamentos, para asegurar la máxima respuesta terapéutica con los mínimos efectos adversos.

Actualmente, en los laboratorios clínicos se emplea mayoritariamente la cromatografía líquida acoplada a diferentes detectores (*ej.* matriz de diodos, fluorescencia o espectrometría de masas) para la determinación de ISDs. Si bien todas estas técnicas proporcionan métodos sensibles y reproducibles, requieren personal debidamente entrenado, en algunos casos su coste es elevado y, en ocasiones, se requieren etapas adicionales de extracción y derivatización, aumentando los tiempos de análisis y la irreproducibilidad del método. Además, estos métodos no son adecuados para la monitorización semicontinua en dispositivos de análisis *in situ* (POC, del inglés *point-of-care*) o para el cribado de alto rendimiento.

El desarrollo de métodos de cribado basados en anticuerpos ha recibido mucha atención, tanto por parte de los laboratorios clínicos como de las empresas de diagnóstico. A diferencia de las técnicas cromatográficas, los inmunoensayos pueden integrarse fácilmente en un laboratorio especializado (automatización, trazabilidad y facilidad de validación del método), o incluso formar parte de un POC. Sin embargo, su principal desventaja es su potencial reactividad cruzada hacia los metabolitos activos o

inactivos de la muestra, dando lugar a una posible sobreestimación de la concentración del analito. No obstante, estos problemas pueden solventarse empleando anticuerpos recombinantes anti-ISD o bioreceptores de unión selectiva al inmunosupresor.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de nuevos biosensores para el análisis de inmunosupresores en muestras de pacientes trasplantados. Con este fin, se han explorado diferentes formatos de ensayo y estrategias de medida, evaluando su impacto en las características analíticas. Se han diseñado nuevos elementos de reconocimiento, o derivados fluorescentes de los analitos, para conseguir una detección más sensible, rápida y selectiva de los inmunosupresores ácido micofenólico (MPA) y tacrolimus (FK506).

En la primera parte de la Tesis se describe el desarrollo de un ensayo homogéneo, basado en medidas de polarización de fluorescencia, donde se evalúan análogos fluorescentes de los inmunosupresores FK506, MPA y ciclosporina A (CsA). Tan solo el análogo del MPA proporcionó la selectividad requerida para los análisis de las muestras de sangre, permitiendo la determinación de MPA libre con un límite de detección (LOD) de 0.8 ng/mL y un intervalo de respuesta lineal entre 1.7-39 ng/mL. La sensibilidad obtenida es excelente, ajustándose a los requerimientos terapéuticos, y mejora los LODs de los inmunoensayos descritos en la bibliografía hasta la fecha de la publicación para este tipo de análisis. No se observó reactividad cruzada frente a otros ISDs administrados generalmente con el MPA (CsA y FK506), ni frente al metabolito MPA glucurónido. El ensayo desarrollado se aplicó al análisis de MPA en suero de una paciente trasplantada, tratada con MPA y FK506, y los resultados fueron validados mediante HPLC-DAD.

En la segunda parte de la Tesis se han desarrollado bioensayos basados en medidas de luminiscencia para el análisis del inmunosupresor FK506. Concretamente, se han diseñado y producido receptores recombinantes fluorescentes como alternativa a los anticuerpos, obtenidos de modelos animales, usados en los inmunoensayos. Las proteínas de fusión sintetizadas están formadas por el receptor FKBP1A, una inmunofilina que forma un complejo con el FK506 confiriéndole así capacidad inmunosupresora, y la proteína verde fluorescente Emerald (EmGFP) o la proteína naranja fluorescente (mOrange2). Esta aproximación ofrece la posibilidad de una producción ilimitada del

elemento de reconocimiento, evitando variaciones entre lotes, a un bajo coste. La interacción entre los receptores recombinantes fluorescentes y el fármaco se evaluó empleando una microbalanza de cristal de cuarzo.

Las proteínas recombinantes se han aplicado al desarrollo de dos tipos de ensayos heterogéneos competitivos. El primero emplea partículas magnéticas funcionalizadas con FK506. Se evaluaron las diferentes construcciones proteicas sintetizadas, obteniéndose mejores resultados con la FKBP1A-EmGFP. El bioensayo desarrollado se ajusta a los requerimientos terapéuticos, mostrando un LOD de 3 ng/mL y un intervalo dinámico entre 5 y 70 ng/mL. No se observó reactividad cruzada frente al MPA, pero sí frente al ISD sirolimus (Sir), que presenta una estructura similar al FK506 y es reconocido en el organismo por el mismo receptor. El ensayo desarrollado se aplicó al análisis de FK506 en muestras de sangre entera de pacientes trasplantados, y los resultados se compararon favorablemente con los evaluados por un laboratorio externo.

En el segundo ensayo optimizado se emplearon micromotores magnéticos Janus de policaprolactona funcionalizados con FK506. Estas micropartículas se desplazan de forma autónoma en disolución, induciendo una eficaz mezcla de los fluidos que permite acelerar las interacciones del elemento de reconocimiento con el micromotor funcionalizado y el analito, mejorando las características analíticas del método. El ensayo se realiza en una única etapa, reduciendo el tiempo de análisis, y se basa en la competición entre el analito y el FK506 inmovilizado en la superficie del motor por el sitio de reconocimiento del receptor fluorescente recombinante adicionado en la muestra. En comparación con el ensayo basado en partículas magnéticas, este ensayo muestra un LOD inferior y un mayor intervalo dinámico, aunque la reproducibilidad es ligeramente inferior (RSD_{media} : 16% vs 10%). La selectividad del ensayo se evaluó midiendo la curva de inhibición competitiva con el MPA y no se observó reactividad cruzada en el intervalo de concentraciones evaluadas. La simplicidad y las características analíticas de este método hacen que tenga un potencial muy prometedor para la futura determinación de FK506 en muestras biológicas.

III. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviaturas

Ab	Anticuerpo
ACMIA	Inmunoensayo magnético con anticuerpos conjugados
AcMPAG	Acil glucurónido del ácido micofenólico
AcNaT	Tampón acetato sódico con Tween [®] 20
AFM	Microscopía de fuerza atómica
Ag	Antígeno
AO	<i>N</i> -(5-((3-aminopropil)amino)-10-metil-9H-benzo[<i>a</i>]fenoxazin-9-iliden)etanaminio
APBA	Ácido 3-aminofenilborónico
APCI	Ionización química a presión atmosférica
API	Ionización a presión atmosférica
ATR	Reflectancia total atenuada
AUC	Área bajo la curva
avGFP	Proteína verde fluorescente de <i>Aequorea victoria</i>
BODIPYs	4-4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza- <i>S</i> -indacenos
BRET	Transferencia de energía de resonancia bioluminiscente
BSA	Albúmina de suero bovino
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida
C ₀	Nivel valle
C ₂	Análisis tras 2 h de la administración del fármaco
C ₂ -NTA	3,3'-Ditiobis[<i>N</i> -(5-amino-5-carboxipentil)propionamida- <i>N',N'</i> -diácido acético
CB	Carbono mesoporoso
CBT	Tampón carbonato con Tween [®] 20
Cdots	Puntos cuánticos de carbono
CE	Electroforesis capilar
CEDIA	Inmunoensayo basado en el empleo de un donador enzimático clonado
C _H	Región constante de la cadena pesada
C _L	Región constante de la cadena ligera
CR	Reactividad cruzada
CsA	Ciclosporina A

CsA-AO	Ciclosporina A funcionalizada con el colorante AO
CV	Coefficiente de variación
DAD	Detector de <i>array</i> de diodos
DBS	Manchas de sangre seca
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido anhidro
DR	Intervalo dinámico
ECD	Detección electroquímica
ECLIA	Inmunoensayo electroquimioluminiscente
EC-MPS	Micofenolato sódico de cubierta entérica
EDA	Etilendiamina
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EmGFP	Proteína verde fluorescente Emerald
EMIT	Inmunoensayo multiplicado enzimáticamente
ESI	Ionización por electrospray
EtOH	Etanol
Eve	Everolimus
Fc	Fragmento cristalizante del anticuerpo
FDA	Administración de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos
FIA	Inmunoensayo de fluorescencia
FK506	Tacrolimus
FK506-AO	Tacrolimus funcionalizado con el colorante AO
FK506-COOH	Derivado carboxilado del tacrolimus
FKBP12	Proteína de unión al FK506
FLD	Fluorescencia
FP	Polarización de fluorescencia (Capítulo 6)
FP	Proteína fluorescente (Capítulo 7)
F.P.	Cebadores directos

FPIA	Inmunoensayo de polarización de fluorescencia
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
GC	Cromatografía de gases
GCC	Glucocorticoides
GFP	Proteína verde fluorescente
GLAD	Deposición de vapor con configuración de ángulo rasante
GO	Grafeno oxidado
GS	Cadena espaciadora formada por glicinas y serinas
HATU	Hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metilmetanaminio
HEPES	Tampón ácido 4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-iletanosulfónico
HisTag	Cola de Histidinas
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRP	Peroxidasa de rábano
HSA	Albúmina de suero humano
IAS	Inmunoensayos
IC ₅₀	Concentración de analito que produce un 50% de inhibición en la unión del marcador
Igs	Inmunoglobulinas
IL-2R	Interleucina IL-2
IMPDH	Enzima inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil- β -D-tio-falactósido
ISD	Medicamento inmunosupresor
KLH	Hemocianina de lapa de ojo de cerradura
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LLE	Extracción líquido-líquido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LSAW	Ondas acústicas superficiales con fugas
LTIA	Inmunoensayo turbidimétrico potenciado con látex
LY	Amarillo lucifer
LYen	Etilendiamina del amarillo lucifer

mAbs	Anticuerpos monoclonales
MB	Partículas magnéticas
MeCN	Acetonitrilo
MEIA	Inmunoensayo enzimático sobre micropartículas
MeOH	Metanol
MEPS	Microextracción con sorbentes empaquetados
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfónico
MEST	Tampón MES con Tween [®] 20
MIPs	Polímeros de impronta molecular
MMF	Micofenolato de mofetilo
MPA	Ácido micofenólico
MPA-AO	MPA funcionalizado con el colorante AO
MPAG	Glucurónido del ácido micofenólico
MPA-LY	MPA funcionalizado con el colorante LY
MPS	Micofenolato de sodio
MS	Espectrometría de masas
mTor	Proteína diana de rapamicina en mamíferos
MW	Peso molecular
NB	Azul Nilo
NIR	Infrarrojo cercano
NPs	Nanopartículas magnéticas
OVA	Ovoalbúmina
PAPBA	APBA polimérico
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	PBS con Tween [®] 20
PCL	Policaprolactona
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PETINIA	Inmunoensayo de inhibición turbidimétrica potenciado con partículas
PFBB	Tampón de bloqueo libre de proteínas Pierce [™]
pI	Punto isoeléctrico
POC	Sensores de diagnóstico inmediato

PP	Precipitación de proteínas
PPIase	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa
PS-DVB	Poli(estireno-co-divinilbenceno)
Pyr	Pirólisis
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo
Qdots	Puntos cuánticos
QMS	Sistema de microesferas para análisis cuantitativo
QuEChERS	<i>Quick, cheap, effective, rugged and safe</i>
QY	Rendimiento cuántico
RIA	Radioinmunoensayo
ROS	Especies reactivas del oxígeno
R.P.	Cebadores reversos
RRLC	Cromatografía líquida de resolución rápida
RSD	Desviación estándar relativa
SAM	Monocapa autoensamblada
scFv	Fragmentos variables de anticuerpo de cadena sencilla
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SELEX	Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial
Sir	Sirolimus o rapamicina
sNHS	<i>N</i> -Hidroxisulfosuccinimida
SPE	Extracción en fase sólida
SPR	Resonancia de plasmón superficial
SPRi	Resonancia de plasmón superficial de imagen
T20	Tween [®] 20
TDM	Monitorización terapéutica de fármacos
TFA	Ácido trifluoroacético
TFC	Cromatografía de flujo turbulento
TIR	Reflexión total interna
TIRF	Fluorescencia de reflexión total interna
T _m	Temperaturas de hibridación
TMCS	Trimetilclorosilano
TRFIA	Inmunoensayo de fluorescencia de tiempo resuelto

Tris	Tampón tris(hidroximetil)aminometano
UF	Ultrafiltración
UPLC	Cromatografía líquida de ultra resolución
UV	Ultravioleta
VAMS	Micromuestreo volumétrico de absorción
V_H	Región variable de la cadena pesada del anticuerpo
vis	Región visible
V_L	Región variable de la cadena ligera del anticuerpo
WB	Sangre entera
β -gal	β -galactosidasa

Símbolos

A	Absorbancia a una longitud de onda determinada
\bar{A}	Área molecular relativa ocupada en la superficie
A_x	Amplitud
A_{max}	Máximo valor asintótico de la señal analítica en un modelo de regresión logística de cuatro parámetros
A_{min}	Mínimo valor asintótico de la señal analítica en un modelo de regresión logística de cuatro parámetros
b	Pendiente de la curva en el punto de inflexión
B	Señal analita obtenida a una concentración dada
B_0	Señal analítica en ausencia de analito
B_∞	Señal analítica correspondiente a una muestra con alto exceso de analito
c	Concentración
d_p	Distancia efectiva de penetración de una onda evanescente
F_\perp	Intensidad de fluorescencia perpendicular al plano de la luz de excitación
F_\parallel	Intensidad de fluorescencia paralela al plano de la luz de excitación
f_0	Frecuencia de resonancia
h	Coefficiente de Hill
K_D	Constante de disociación

k'_d	Pseudo constante de unión
l	Paso óptico
m	Masa
n_x	Índice de refracción de un medio x
n	Numero del sobretono
N_A	Número de avogadro
P	Polarización de fluorescencia
P_o	Polarización limite experimental
r	Anisotropía de fluorescencia
R	Constante de Boltzmann de los gases ideales
T	Temperatura
V	Volumen molecular
ΔD	Variación de la energía de disipación
Δf	Variación de la frecuencia de resonancia
$(\Delta m/A)_{sat}$	Densidad de masa superficial de saturación
ε	Coefficiente de absorción molar
Φ_f	Rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia
η	Viscosidad
λ	Longitud de onda
μ_q	Módulo de cizalladura del cristal de cuarzo
θ_c	Ángulo crítico
θ_i	Ángulo de un haz incidente
ρ	Tiempo que tarda la molécula en rotar un ángulo de 68.5°
ρ_q	Densidad del cristal de cuarzo
τ_x	Constantes de tiempo expresadas en segundos

Notas de estilo

1. Con objeto de homogenizar el criterio de nomenclatura a lo largo de la presente Tesis Doctoral, los decimales no serán indicados con comas, sino con puntos.
2. Las referencias bibliográficas, gestionadas con el programa Zotero (v. 6.0.4), se muestran en formato de la revista *Analytical Chemistry*, de la *American Chemical Society*.

IV. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Terapia inmunosupresora

La inmunosupresión se basa en la reducción de la eficacia de la respuesta del sistema inmunológico frente a sustancias extrañas. Esto puede ser resultado de la aplicación de terapias que incluyen medicamentos inmunosupresores (ISDs, del inglés *immunosuppressant drugs*) o de radiación, de una esplenectomía o por causa de diversas enfermedades.^{1,2}

La presente Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de sistemas de detección rápidos para la monitorización terapéutica de medicamentos inmunosupresores administrados para el tratamiento del rechazo de órganos trasplantados. Concretamente se han incluido en el estudio el ácido micofenólico y el tacrolimus que se utilizan, principalmente, en pacientes trasplantados de hígado, riñón, corazón y pulmón.

1.1. Mecanismos generales de acción

Los inmunosupresores actúan sobre los linfocitos T (responsables de la regulación de la inmunidad celular). De acuerdo con el mecanismo de acción pueden clasificarse en tres grupos, dependiendo de si interfieren en la transmisión del estímulo al núcleo celular (glucocorticoides o moduladores de inmunofilinas), en la división celular (citostáticos) o en la acción antígeno-receptor (anticuerpos).³

1.1.1. Glucocorticoides

Los glucocorticoides (GCC) o corticosteroides están formados por una estructura central esteroidal con diferentes grupos funcionales que confieren al compuesto su capacidad antiinflamatoria. La estructura esteroidal contiene tres anillos de seis miembros fusionados entre sí junto con un anillo de cinco miembros (**Figura 1**).⁴ Como consecuencia, presentan naturaleza lipofílica y muestran baja solubilidad en agua, precisando modificaciones químicas para mejorar su solubilidad y eficacia médica.

Los GCC atraviesan la membrana celular mediante una difusión pasiva y, tras unirse a receptores citoplasmáticos, se translocan al núcleo. Allí inactivan los genes

que codifican la producción de citoquinas y ciertas interleucinas, reduciendo la tasa de proliferación de los linfocitos T y con ello la respuesta inmunológica.⁵

Estos medicamentos fueron los primeros en los que se observó un potente efecto inmunosupresor, ya que actúan reduciendo la respuesta inflamatoria y modulando la respuesta inmunológica. Por ello, sus primeras aplicaciones se dirigieron a evitar el rechazo del nuevo órgano en pacientes trasplantados. Actualmente, se siguen usando con el mismo propósito en combinación con otros medicamentos, pero también están prescritos para el tratamiento de trastornos inmunes y reacciones alérgicas gracias a su amplio espectro de actividad inmunomoduladora. Como parte del régimen inmunosupresor la prednisona y la metilprednisolona son los dos glucocorticoides administrados de forma más habitual.^{6,7}

1.1.2. Moduladores de inmunofilinas

Los moduladores de inmunofilinas son compuestos con un alto carácter lipofílico y, aunque su estructura puede variar de manera muy amplia, tienen en común la presencia de un anillo macrólido de lactona compartiendo propiedades fisicoquímicas. También se someten a un metabolismo similar en el cuerpo a través de la familia de isoenzimas CYP3A4, las cuales los transforman en sustancias más polares y excretables.

Los medicamentos pertenecientes a este grupo se unen a las proteínas citosólicas inmunofilinas, originando complejos que presentan efecto inmunosupresor. Estos complejos proteína-fármaco pueden presentar dos mecanismos de actuación diferentes. En el primero, los inhibidores de calcineurina provocan que la primera fase de activación de los linfocitos T se detenga, ya que el complejo inmunofilina-ISK inhibe la producción de calcineurina y con ello se reduce la desfosforilación de los factores de transcripción, evitando su translocación al núcleo.^{8,9} Los inhibidores de calcineurina más relevantes son el tacrolimus y la ciclosporina A.

Por lo que respecta al segundo mecanismo, el complejo proteína-fármaco puede inhibir a la proteína diana de rapamicina en mamíferos (mTOR, del inglés *mammalian Target of Rapamycin*), bloqueando la activación de la síntesis proteica y deteniendo la

mitosis en la fase G₁.^{9,10} Como consecuencia se suprime la activación y la proliferación de los linfocitos T, disminuyendo la producción de anticuerpos.¹¹ Algunos de los inhibidores mTOR actualmente aprobados por la Agencia Europea del Medicamento son el sirolimus,¹² el everolimus¹³ o el temsirolimus.¹⁴

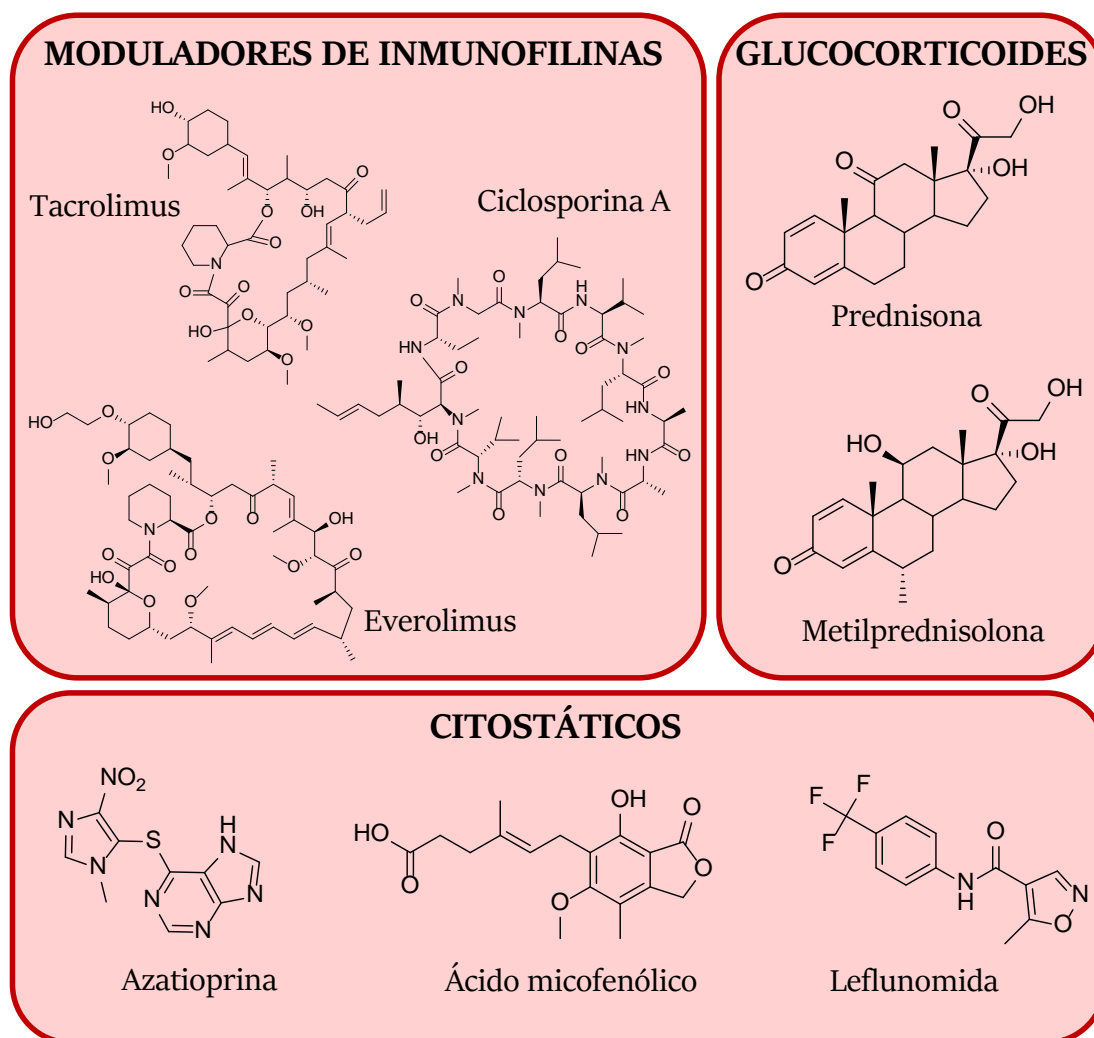


Figura 1. Estructura química de algunos ISDs clasificados según su mecanismo de acción.

1.1.3. Citostáticos

Los compuestos citostáticos son fármacos que inhiben la división celular y reducen la proliferación de los linfocitos T y B, por lo que se suelen emplear en quimioterapia y como agentes inmunosupresores a concentraciones bajas.^{10,15} Los compuestos citostáticos más empleados en terapia inmunosupresora son los denominados antimetabolitos. Se tratan de análogos de compuestos naturales que

interfieren en la mitosis, inhibiendo la síntesis de ADN o la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa. Ejemplos de estos fármacos son la azatioprina y el mofetil micofenolato como inhibidores de la síntesis *de novo* de purinas, y la leflunomida como inhibidor de la síntesis *de novo* de la pirimidina.

1.1.4. Inmunosupresores biológicos

Hoy en día, gracias a su elevada especificidad, se emplean de forma rutinaria una amplia variedad de anticuerpos policlonales, monoclonales y recombinantes para prevenir y tratar el rechazo de órganos. Su uso comenzó en la década de 1960 con el empleo de anticuerpos policlonales capaces de neutralizar la acción natural de los linfocitos.¹⁶ Más tarde, se desarrollaron anticuerpos monoclonales dirigidos a ciertos subgrupos de células específicas, como el OKT3,¹⁷ aunque en los últimos años se han producido anticuerpos de mayor especificidad dirigidos a moléculas funcionales secretadas por el sistema inmune o a ciertos receptores del mismo.¹⁶

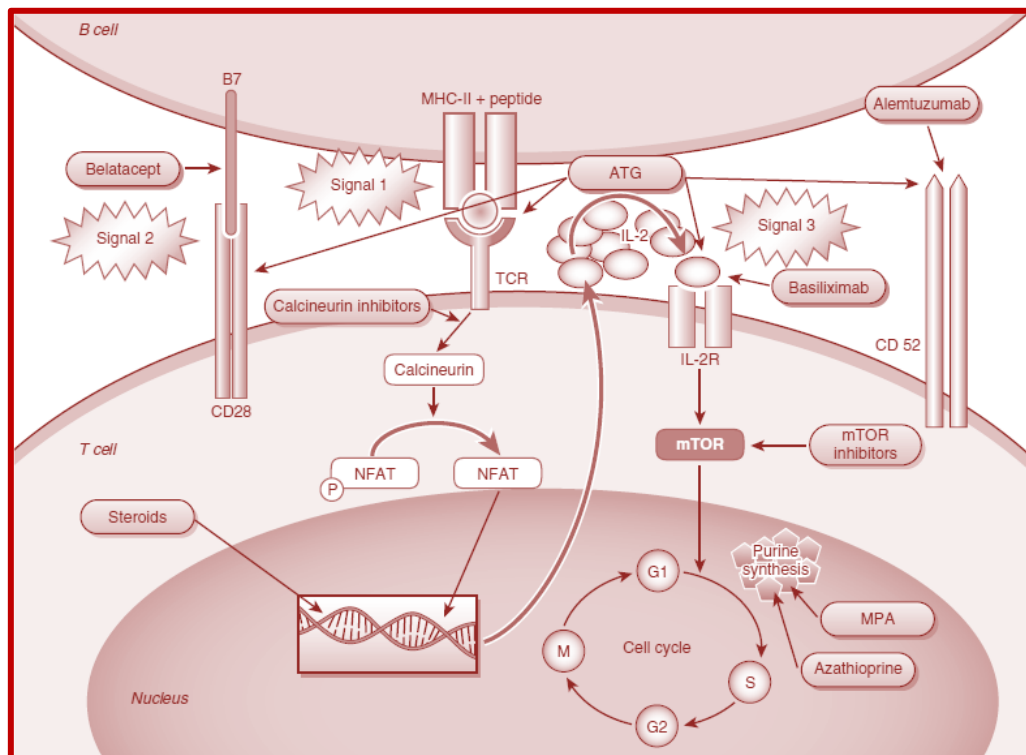


Figura 2. Vías de activación de las células T y objetivos de la inmunosupresión.⁹

En la actualidad, los anticuerpos más utilizados en terapias inmunosupresoras son los monoclonales basiliximab y daclizumab, desarrollados contra el receptor de la interleucina IL-2 (IL-2R). Ambos han sido genéticamente modificados para que contengan secuencias humanizadas y evitar así que el organismo rechace el tratamiento.¹⁸

1.1.5. Otros inmunosupresores

Existen otros tipos de inmunosupresores que no siguen ninguno de los mecanismos descritos anteriormente, en los que el fármaco producía una disminución de la activación o producción de los linfocitos. Un ejemplo es el fingolimod que, al unirse a ciertos receptores de los linfocitos, produce una retención selectiva y reversible de estos dentro de los ganglios linfáticos.¹⁹

1.2. Usos y aplicaciones

Los inmunosupresores son medicamentos utilizados habitualmente para controlar las manifestaciones más graves de enfermedades alérgicas, autoinmunes y asociadas a los trasplantes. Algunos fármacos tienen un efecto difuso en el sistema inmunológico, mientras que otros tienen objetivos específicos. Los medicamentos de efecto difuso tienen más probabilidades de causar reacciones adversas, aunque la eficacia de los medicamentos más específicos puede reducirse si su acción se anula al discurrir por vías metabólicas alternativas.²⁰

1.2.1. Trasplantes

Se denomina trasplante a la acción de transferir un órgano, células, o tejido sano de un donante a un receptor para sustituir otro que está dañado y es incapaz de realizar correctamente sus funciones fisiológicas, evitando así la muerte del receptor y mejorando su calidad de vida.¹⁶

El concepto de trasplante de órgano tiene miles de años de antigüedad, ya que en las antiguas culturas griegas, romanas y chinas existían leyendas de trasplantes realizados por dioses y curanderos. Los primeros registros médicos de autoinjertos

datan del siglo VI a.C, en el texto sánscrito Sushruta Samhita.²¹ A finales del siglo XVI d.C. el cirujano Gasparo Tagliacozzi realizó rinoplastias a partir de autoinjertos y fue el primero en reportar eventos de rechazo al usar piel de donantes fallecidos.²² Pero no fue hasta tres siglos más tarde, en 1905, cuando se realizó el primer trasplante de córnea con resultados satisfactorios.²³ Gracias al avance de las técnicas quirúrgicas, le siguieron trasplantes de riñones, corazón, pulmones y otros órganos. Sin embargo, la tasa de supervivencia a largo plazo era baja, bien por rechazo o porque el sistema inmune se encontraba comprometido a causa de los inmunosupresores empleados.⁹

Los trasplantes se pueden clasificar de diversas formas, ya sea por el tipo de donante (vivo, fallecido por muerte cerebral o por parada cardiorrespiratoria) o dependiendo del material trasplantado (órgano, tejido o células). La forma más común de clasificarlos es considerando la identidad genética entre el donante y el receptor:¹⁶

a) *Autotrasplante o autoinjerto*: consisten en la colocación de un tejido u órgano de un mismo individuo desde un lugar a otro de su propio organismo. Por lo general se trata de piel, hueso, vasos sanguíneos, células madre o médula ósea. Estos tejidos autólogos trasplantados son muy bien tolerados biológicamente y no provocan reacción de rechazo de ningún tipo.

b) *Isotrasplantes o isoplastias*: se denominan así los trasplantes en los que el donante y el receptor son genéticamente idénticos, como es el caso de los gemelos univitelinos.

c) *Alotrasplantes u homotrasplante*: aquellos trasplantes efectuados con un donante y un receptor que pertenecen a la misma especie, pero son genéticamente diferentes.

d) *Xenotrasplantes o heterotrasplantes*: este caso es el menos viable de todos, ya que ni el donante ni el receptor pertenecen a la misma especie. Esta estrategia presenta un gran interés, dado que la disponibilidad de órganos humanos es muy escasa. Los órganos de cerdo se consideran los más favorables debido a que su tamaño y funcionalidad son similares a los de los órganos humanos. Sin embargo, esta práctica no sólo entraña problemas éticos sino también patológicos, ya que el riesgo de inducir

una enfermedad (zoonosis) en el receptor es muy elevado y potencialmente infeccioso.^{24,25}

Hoy en día, la demanda de trasplantes de órganos ha aumentado significativamente en todo el mundo, llegándose a realizar en el año 2019 más de 153,800 intervenciones en 84 países, según los datos del Observatorio Mundial de Donación y Trasplante y de la Organización Mundial de la Salud.²⁶ Por desgracia, estos datos no reflejan la necesidad real, ya que la demanda de trasplantes sigue superando la oferta de órganos. El éxito del trasplante y la correcta recuperación del paciente dependen, en gran parte, de mantener en el paciente los niveles adecuados de medicamentos inmunosupresores, gracias a los cuales se ha conseguido reducir la tasa de rechazo agudo al 15.4%, la de pérdida del injerto al 3.6% y la de muerte a tan solo el 2.8% en el primer año posterior al trasplante.²⁷

El éxito de estas intervenciones se debe, en gran medida, al control del proceso de rechazo, gracias a una comprensión cada vez más profunda del proceso inmunológico desencadenado por un trasplante y procurando que los sistemas de histocompatibilidad del donante y el receptor sean lo más compatibles posible.

El rechazo de un injerto es un proceso complejo en el que intervienen varios componentes, como los linfocitos T, los linfocitos B, los macrófagos y las citoquinas, con la consiguiente lesión inflamatoria local y el daño del injerto.^{16,28} En función del tiempo y la patogénesis, el rechazo puede clasificarse en los grupos que se indican a continuación:^{28,29}

- *Hiperagudo*: este tipo de rechazo puede producirse desde minutos a varios días después del trasplante debido a problemas de histocompatibilidad. Se debe a que el receptor posee anticuerpos específicos frente al donante, los cuales se unen al endotelio vascular del injerto y provocan la activación de las plaquetas junto a la coagulación intravascular. Como consecuencia, se produce la pérdida de la funcionalidad del injerto por necrosis. Para minimizar la posibilidad del rechazo hiperagudo es necesario llevar a cabo cuidadosos estudios de compatibilidad antigénica entre el donante y el receptor.

- *Agudo*: suele observarse a los pocos días o meses del trasplante. Aunque es la forma más común de rechazo, cada vez se producen menos casos debido al uso de la inmunosupresión moderna. Se cree que el rechazo agudo es un proceso mediado predominantemente por los linfocitos T al invadir el órgano donado, reaccionando con los antígenos leucocitarios humanos (HLA, del inglés *human leukocyte antigen*) del donante e induciendo la expansión clonal y la destrucción celular. No obstante, también están involucrados los linfocitos B que generan anticuerpos anti-HLA donante, que pueden dañar el injerto. Los actuales ISDs provocan que la mayoría de estos episodios sean asintomáticos y sólo se manifiesten con valores clínicos anormales (ej. niveles elevados de transaminasas en los receptores de trasplantes de hígado).

- *Crónico*: ocurre en menor medida con todos los tipos de trasplantes y se caracteriza clínicamente por el lento deterioro del órgano, durante meses o años, hasta la pérdida de la función. No se conoce totalmente la razón de este rechazo, ya que es probable que estén involucrados tanto mecanismos inmunes como no inmunes, por ejemplo el estrés oxidativo continuo.

Para evitar los eventos de rechazo y según el tipo de trasplante, se usan diferentes concentraciones de ISDs. Actualmente las terapias inmunosupresoras consisten en la combinación de al menos dos compuestos con diferentes mecanismos de acción,³⁰ pudiendo así reducir las dosis de cada uno de ellos, minimizando los efectos secundarios, las tasas de rechazo y la resistencia al tratamiento.

Existen trasplantes que gozan de una mejor viabilidad, como son los de córnea y otros tejidos, denominados privilegiados, ya que no van acompañados de reacciones de rechazo; esto es debido a que estos tejidos carecen de circulación linfática, lo que impide el intercambio de antígenos y defensas orgánicas propias.^{31,32}

Dado que uno de los mayores problemas de los trasplantes es la disponibilidad de órganos de donantes, una de las metas actuales es conseguir órganos artificiales completamente funcionales con los que se pueda minimizar el riesgo de rechazo partiendo de células del propio paciente. El mayor reto en este caso es conseguir imitar todas las funciones de los tejidos que forman el órgano, por lo que se están estudiando

diferentes materiales y técnicas de fabricación como puede ser el uso de impresoras 3D.³³⁻³⁶

1.2.2. Enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes están causadas por una respuesta inmunológica inapropiada que origina una sobreactivación del sistema inmunológico atacando y destruyendo los tejidos sanos en lugar de dirigirse a antígenos exógenos.³⁷ Se tratan de patologías crónicas, y poco conocidas, que pueden propagarse a todo el cuerpo (sistémicas) o limitarse a ciertos órganos (específicos).³⁸ Existen alrededor de 100 enfermedades autoinmunes, y forman parte de las enfermedades más comunes afectando, aproximadamente, al 8% de la población.³⁹ Los ejemplos más conocidos de estas enfermedades incluyen la psoriasis, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple y la diabetes *mellitus* tipo 1.

El tratamiento de los trastornos autoinmunes se basa únicamente en la inmunosupresión sistémica o en la inmunosupresión dirigida a las células. Aunque hasta hace pocos años se usaban solo medicamentos sintéticos, se han empezado a introducir en el uso clínico las terapias biológicas empleando anticuerpos,^{40,41} interferones⁴² o proteínas de fusión.⁴³⁻⁴⁵ Estos compuestos están diseñados para regular la respuesta inmunológica utilizando una serie de estrategias diferentes, tales como la terapia con anticuerpos anti-citoquinas dirigida a las células T y a las células B.³⁸ De esta forma se consiguen tratamientos más focalizados y con menos efectos adversos.

1.3. Inmunosupresores usados en trasplantes

Actualmente se emplean diferentes ISDs para el tratamiento del rechazo en trasplantes, así como en terapias combinadas según el tipo de órgano trasplantado y la etapa en la que se encuentre. Entre ellos cabe destacar el ácido micofenólico, el tacrolimus, la ciclosporina A o el sirolimus, que se describen a continuación.

1.3.1. Ácido micofenólico

El ácido micofenólico (MPA, del inglés *mycophenolic acid*), es una micotoxina producida por hongos de la familia de los *Penicillium* y, de hecho, es un contaminante alimentario que puede encontrarse en derivados lácteos y piensos⁴⁶ al ser producido por *Penicillium Roqueforti*.⁴⁷

Aunque fue descubierto en 1896 y su estructura (**Figura 3B**) se determinó en 1952, no fue hasta 1996 cuando se aprobó su uso como terapia inmunosupresora.⁴⁸ A parte de la actividad inmunosupresora, el MPA muestra también actividad antibacteriana,⁴⁶ antiviral, antifúngica y antitumoral.⁴⁷ El principal mecanismo de acción del MPA consiste en el bloqueo de la proliferación de linfocitos (tanto T como B), al inhibir de forma no competitiva la enzima inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), esencial para la síntesis *de novo* de la purina.⁴⁷

El uso más extendido de este fármaco es en la profilaxis del rechazo agudo de trasplantes renales, cardíacos o hepáticos, en combinación con ciclosporina, tacrolimus o corticoesteroides. Debido a su menor toxicidad y efectos secundarios respecto a otros inmunosupresores, también se emplea en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la psoriasis,⁴⁹ uveítis⁵⁰ y dermatitis atópica, entre otras.

El MPA se une de forma eficiente a la albúmina (97–99%).⁵¹ Sin embargo, muchos estudios demuestran que únicamente la fracción libre del fármaco es farmacológicamente activa, ya que puede atravesar las membranas celulares y unirse a los receptores correspondientes, promoviendo los efectos inmunosupresivos.⁵² De hecho, está descrito^{53,54} que la monitorización de MPA libre en muestras biológicas (plasma, suero o sangre entera) proporciona una mejor correlación con la eficacia clínica del medicamento que la concentración total.⁵⁵

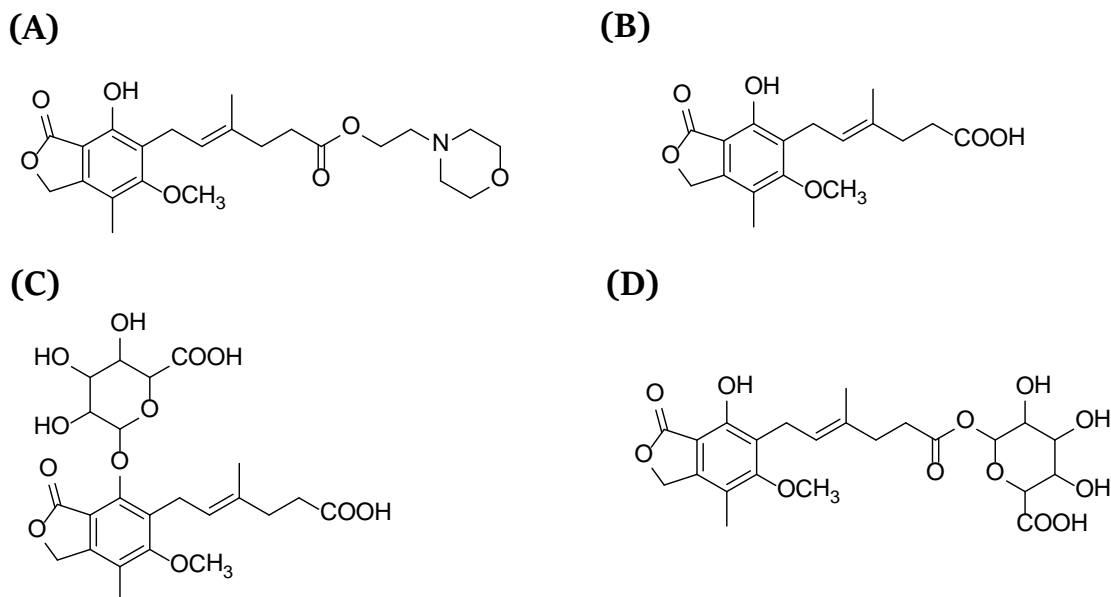


Figura 3. Estructura química de: (A) MMF, (B) MPA, (C) MPAG y (D) AcMPAG.

Para aumentar la biodisponibilidad, el MPA se administra en dos formas galénicas diferentes: formando un éster, micofenolato de mofetilo (MMF) (**Figura 3A**), o como sal de sodio, micofenolato de sodio (MPS). Recientemente se ha desarrollado una nueva formulación, el micofenolato sódico de cubierta entérica (EC-MPS, del inglés *enteric-coated mycophenolate sodium*), que ha sido diseñado para reducir los efectos adversos del tracto gastrointestinal superior, retardando la liberación de MPA y proporcionando, al mismo tiempo, una inmunoprotección eficaz.⁵⁶

Se han identificado dos metabolitos diferentes del MPA, formados principalmente por la acción de la enzima uridina difosfato glucuroniltransferasa.^{57,58} El metabolito mayoritario es el glucurónido del ácido micofenólico (MPAG, del inglés *7-O-MPA-β-glucuronide*) (**Figura 3C**), inactivo biológicamente aunque forma parte de la circulación enterohepática donde vuelve a transformarse en MPA y es reabsorbido por la flora intestinal. Este recirculado contribuye a la alta biodisponibilidad del MPA y explica la aparición de picos secundarios en el perfil de concentración-tiempo del MPA.⁵⁹ Por otro lado, el acil glucurónido del MPA (AcMPAG, del inglés *mycophenolic acid acyl-glucuronide*) (**Figura 3D**) es el metabolito minoritario del MPA pero, a diferencia del MPAG, ha demostrado tener una acción farmacológica dependiente de la concentración similar a la del fármaco parental.⁴⁷

La ventana terapéutica del MPA se encuentra en el intervalo de concentración predosis de 1 a 3.5 µg/mL (concentración bajo la curva de 30 – 60 µg·h/mL). Para concentraciones predosis inferiores a 1 µg/mL existe una mayor incidencia de rechazo.^{60,61} A concentraciones mayores de 3.5 µg/mL se han observado complicaciones en cuanto a toxicidad gastrointestinal, hematológica y aumento de la frecuencia de cuadros infecciosos.

1.3.2. Tacrolimus

El tacrolimus (FK506, derivado de *Tsukuba macrolide immunosuppressant*) es un macrólido hidrofóbico, con un anillo de lactona de 23 miembros (**Figura 1**), aislado de la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*. Actúa uniéndose a la calcineurina e inhibiéndola a través de un complejo de inmunofilinas (FKBP-FK506), que inhibe la producción de interleucina-2 necesaria para el crecimiento de los linfocitos T.⁶²⁻⁶⁴

Este fármaco inmunosupresor aparece como un polvo cristalino blanco, insoluble en agua, ligeramente soluble en hidrocarburos saturados y altamente soluble en disolventes orgánicos. Se metaboliza por el citocromo P450 3A4, por lo que sus concentraciones se ven afectadas por fármacos que inhiben (bloqueadores de los canales de calcio, antifúngicos, etc.) o inducen (anticonvulsivos) a esta enzima.⁶⁵ Tras varias reacciones de desmetilación e hidroxilación el fármaco se metaboliza en 8 derivados. Numerosos autores han reportado que estos metabolitos originan cierta reactividad cruzada en los inmunoensayos.^{66,67}

El FK506 fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) en 1994 para la profilaxis del rechazo de órganos en pacientes que habían recibido un alotrasplante de hígado. Hoy en día, su aprobación se ha ampliado para incluir el tratamiento de otros trasplantes de órganos como riñón, corazón, intestino delgado, pulmón, tráquea y piel, y también se utiliza para tratar casos de eczemas atópicos de carácter moderado a grave.^{68,69} La terapia inmunosupresora actual consiste en una combinación entre el FK506 e inhibidores de la señal mTOR (sirolimus o everolimus) y glucocorticoides, lo

que mejora significativamente las tasas de supervivencia de los receptores de trasplantes.⁷⁰

La Conferencia Europea para el Consenso en la Optimización del Tacrolimus, recomendó en 2007 que el límite inferior de cuantificación para los métodos de monitorización de tacrolimus debía ser inferior a 1 ng/mL.^{66,71} Las dosis terapéuticas recomendadas para pacientes con un riesgo normal de rechazo suelen oscilar entre 5 y 20 ng/mL.

La fracción libre de FK506 (no unido a proteínas) se encuentra entre el 1 y el 5% de la cantidad total en sangre,⁷²⁻⁷⁴ y es la responsable de la actividad farmacológica y de los efectos secundarios del compuesto. Por lo tanto, el control de este medicamento en los pacientes trasplantados requiere la aplicación de métodos analíticos fiables y eficaces que permitan determinar dicha fracción. No obstante, incluso realizando una monitorización terapéutica exhaustiva del FK506 puede producirse el rechazo del injerto, reportándose tasas de rechazo agudo entre el 8% y el 15%.⁷¹

La actividad inmunosupresora *in vitro* del FK506 es entre 10 y 100 veces superior a la de la ciclosporina A,⁶² presentando unos efectos secundarios menos pronunciados. No obstante, su carácter nefrotóxico contribuye a la aparición de insuficiencias renales en los pacientes a largo plazo. Además, puede agravar la hipertensión y la hiperlipidemia, aumentando el riesgo de diabetes e infecciones virales.

1.3.3. Ciclosporina A

La ciclosporina A (CsA) es un endecapéptido cíclico lipofílico compuesto por aminoácidos *N*-metilados (**Figura 4A**), que le confieren resistencia a la digestión intestinal;³⁰ también contiene aminoácidos inusuales como la D-alanina.⁷⁵ Fue aislado en 1971 del hongo *Tolypocladium inflatum*⁷⁶ e introducido en 1983 para uso médico como inmunosupresor por su potente inhibición del rechazo celular en trasplantes.⁷⁷

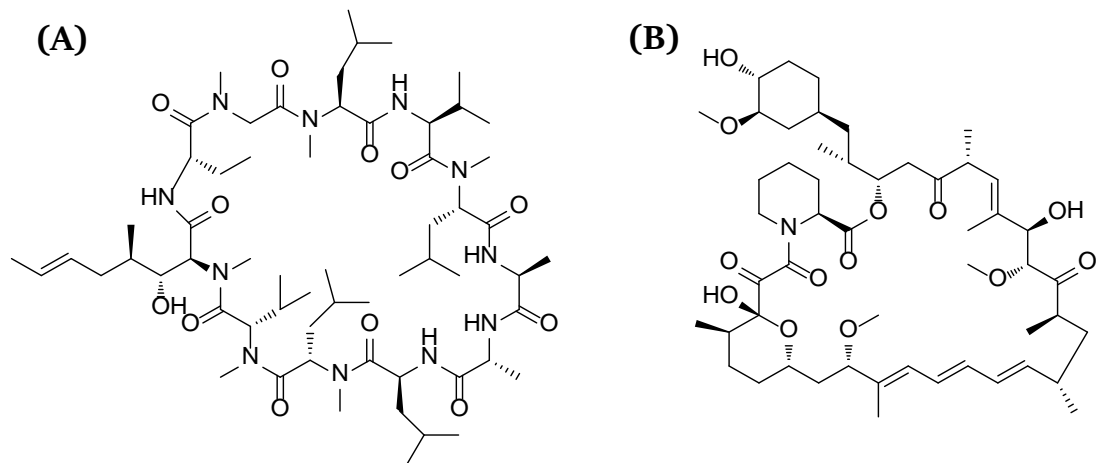


Figura 4. Estructura química de: **(A)** ciclosporina A y, **(B)** sirolimus.

La CsA tiene un mecanismo de acción semejante al FK506 como inhibidor de la calcineurina. Actúa como un profármaco, activándose al unirse a la proteína intracelular de unión ciclofilina (inmunofilina), por lo que el compuesto activo desde el punto de vista biológico es el complejo CsA-ciclofilina.

El metabolismo de la CsA se lleva a cabo principalmente a través del sistema del citocromo P450 3A (CYP3A), observándose una amplia variabilidad en la absorción y dando lugar a más de 25 metabolitos diferentes. Ocho de esos metabolitos han sido aislados y analizados, presentando una actividad inmunosupresora inferior al 10%.⁷⁸

Por su naturaleza, la CsA se distribuye ampliamente en sangre, plasma y entre los tejidos, acumulándose en órganos ricos en grasa (tejido adiposo e hígado). En la sangre tiende a unirse a los eritrocitos en concentraciones variables, dependiendo de la temperatura⁷⁹ y los diferentes niveles de componentes sanguíneos. En el plasma se une a las lipoproteínas y, en menor medida, a la HSA quedando aproximadamente un 2% libre.⁸⁰

Además, se caracteriza por su baja solubilidad en agua y tiene un bajo potencial de bioacumulación. Se administra oralmente en forma de microemulsiones para aumentar su biodisponibilidad.⁸¹ Las dosis terapéuticas recomendadas suelen oscilar entre 100 y 300 ng/mL en sangre entera.

La CsA se ha empleado para prevenir el rechazo en trasplantes de médula ósea, riñón, hígado, corazón, páncreas, pulmón y corazón-pulmón. Aunque su uso se ha ido

sustituyendo gradualmente por el FK506, actualmente se sigue recetando aproximadamente al 10% de los trasplantados.³⁰ Se suele utilizar en combinación con MPA, azatioprina y glucocorticoides, lo que disminuye las tasas de rechazo del primer año a menos del 50% y mejora las tasas de supervivencia del injerto a más del 85%.⁹ Asimismo, también se emplea en el tratamiento de la artritis reumatoide, la psoriasis, la dermatitis atópica o la colitis ulcerosa. Presenta unos efectos secundarios similares a los del FK506, aunque la incidencia en algunos casos es mayor cuando se emplea CsA.

1.3.4. Sirolimus

El sirolimus o rapamicina (Sir) es una lactona macrocíclica de 31 miembros (**Figura 4B**), aislada en la década de 1970 a partir de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* presente en muestras de suelo de la isla de Pascua.^{82,83} Se aisló en el marco de un programa dirigido al descubrimiento de agentes antimicrobianos a partir de fuentes naturales y, tras su purificación, se comprobó que mostraba también una potente actividad antifúngica y propiedades antitumorales.⁸⁴ Sin embargo, su actividad inmunosupresora no se empezó a investigar hasta que se confirmó el potencial de un agente estructuralmente similar, el FK506.

El Sir se une de igual manera que el FK506 a las inmunofilinas FKBP. Sin embargo, el complejo Sir-FKBP no inhibe la calcineurina, sino que presenta un mecanismo de acción diferente. En su lugar, este complejo actúa como un inhibidor del mTOR, bloqueando varias rutas específicas de transducción de señales, lo que produce la inhibición de los linfocitos y en consecuencia la inmunosupresión.

Este fármaco se metaboliza principalmente en el intestino y en el hígado por el sistema del citocromo P450 (CYP3A), aunque la bomba de eflujo P-glicoproteína también controla el metabolismo, regulando su biodisponibilidad.⁸⁵ En estos procesos, el Sir se hidroxila y desmetila dando lugar a más de siete metabolitos diferentes que representan, aproximadamente, el 55% de los niveles de Sir en sangre.⁶ La distribución del Sir en la sangre entera no depende de la temperatura, encontrándose aproximadamente un 94.5% en eritrocitos, tan solo un 3% en el plasma sanguíneo y menos del 0.1% circulando de manera libre.⁸⁶

Al igual que el FK506, este fármaco es soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, pero prácticamente insoluble en agua. Se administra oralmente en disolución con etanol o como cápsulas sólidas, y puede administrarse solo o en concomitancia con otros inmunosupresores como FK506 o CsA.⁸⁷ Las dosis terapéuticas recomendadas en sangre entera se encuentran entre 5 y 20 ng/mL.⁸⁸

El SiR posee una actividad inmunosupresora equivalente a la del FK506 y hasta 100 veces superior a la de la CsA.⁸⁹ Se emplea principalmente para prevenir el rechazo en trasplantes de riñón, pero también se ha usado en el tratamiento de trasplantes de páncreas, corazón y pulmón.⁹⁰

1.4. Monitorización terapéutica para el control de la inmunosupresión farmacológica

Existen numerosos problemas asociados a la inmunosupresión, como son sus efectos secundarios, por lo que es necesario llegar a un equilibrio entre los efectos terapéuticos y sus contraindicaciones (**Figura 5**).

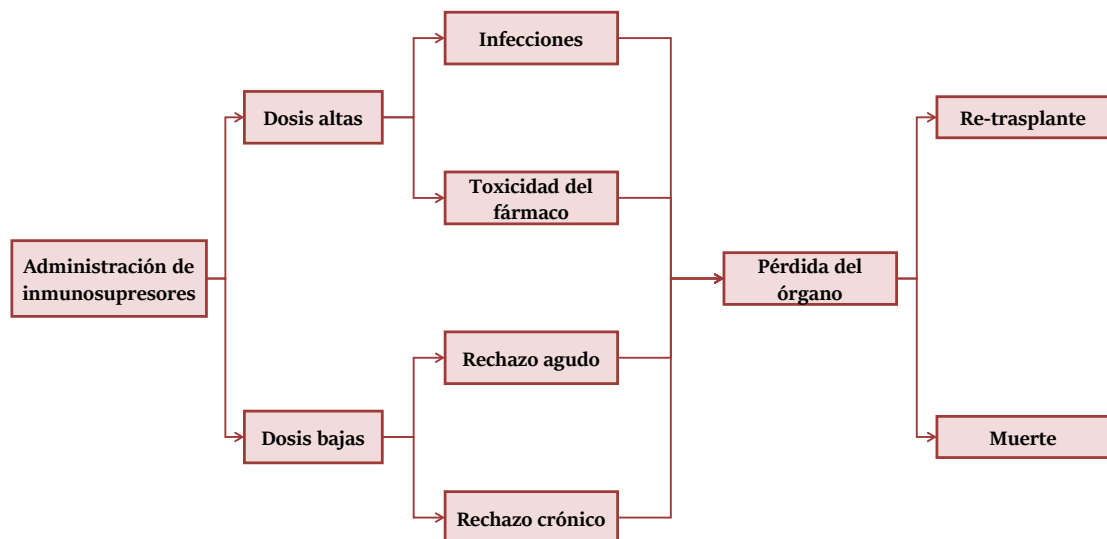


Figura 5. Esquema de los problemas asociados con la inmunosupresión.

Este tipo de terapias inmunosupresoras, pueden suprimir el sistema inmune hasta el punto de que la inmunidad residual que queda es insuficiente para combatir posibles infecciones o prevenir la aparición de neoplasias.⁹¹ No obstante, el uso de

concentraciones bajas puede provocar diferentes eventos de rechazo y con ello la pérdida del injerto trasplantado.

La monitorización terapéutica de fármacos (TDM, del inglés *therapeutic drug monitoring*) ha sido definida por la Asociación Internacional para la Vigilancia de los Fármacos Terapéuticos y la Toxicología Clínica como “aquellas mediciones llevadas a cabo en el laboratorio de un parámetro que, con la adecuada interpretación, influirán directamente en los procedimientos de prescripción”. De forma habitual, estas son mediciones que se realizan en matrices biológicas de un xenobiótico prescrito, pero también pueden ser de un compuesto endógeno recetado como terapia de reemplazo en un individuo que es fisiológica o patológicamente deficiente en ese compuesto, como por ejemplo la insulina.⁹²

Desde principios de la década de 1970 viene realizándose la TDM como una práctica clínica para individualizar la terapia con fármacos. El principal objetivo es optimizar la respuesta farmacológica y evitar la toxicidad iatrogénica, bien basándose en información farmacogenética y clínica (TDM *a priori*), o complementándose con medidas de la concentración del medicamento, sus metabolitos o marcadores (TDM *a posteriori*). Ante la imposibilidad de medir la concentración de los fármacos en los sitios de acción, se asume que las variaciones de su concentración en sangre son una evidencia indirecta de lo que ocurre en los tejidos y, en consecuencia, estarán relacionadas con el efecto farmacológico. Bajo esta premisa, el TDM *a posteriori* será útil únicamente si se conoce la relación entre la concentración en sangre y su efecto clínico. En consecuencia, el fármaco monitorizado debe cumplir los siguientes criterios:^{93,94}

- Presentar un intervalo estrecho entre las concentraciones terapéuticas y las tóxicas, o no efectivas.
- Existir una baja correlación entre la dosis administrada y su efecto clínico, debido a variaciones en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco.

- Mostrar una buena correlación entre la concentración del medicamento en la sangre o en el suero y su efecto clínico.
- Que sea difícil interpretar su baja toxicidad o efecto terapéutico basándose en evidencias clínicas.

En consecuencia, tan solo una pequeña fracción de los medicamentos prescritos actualmente, aproximadamente treinta, precisan de esta monitorización,⁹⁵ y se realiza de forma rutinaria en los laboratorios de los hospitales. Entre ellos, se incluyen el FK506, el MPA y la CsA que han sido objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

1.4.1. Farmacocinética y farmacodinámica

Dos conceptos básicos a la hora de monitorizar medicamentos son la farmacocinética y la farmacodinámica. El primero hace referencia a cómo se asimilan en el organismo, como son por ejemplo los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción del compuesto; mientras que el segundo está relacionado con la forma en la que el fármaco afecta al organismo, en términos de interacciones con los receptores celulares y sus efectos fisiológicos y bioquímicos.⁹⁶ En la **Figura 6**, se muestra la relación entre la farmacocinética y la farmacodinámica, junto con todos los procesos que intervienen tras la administración del medicamento.

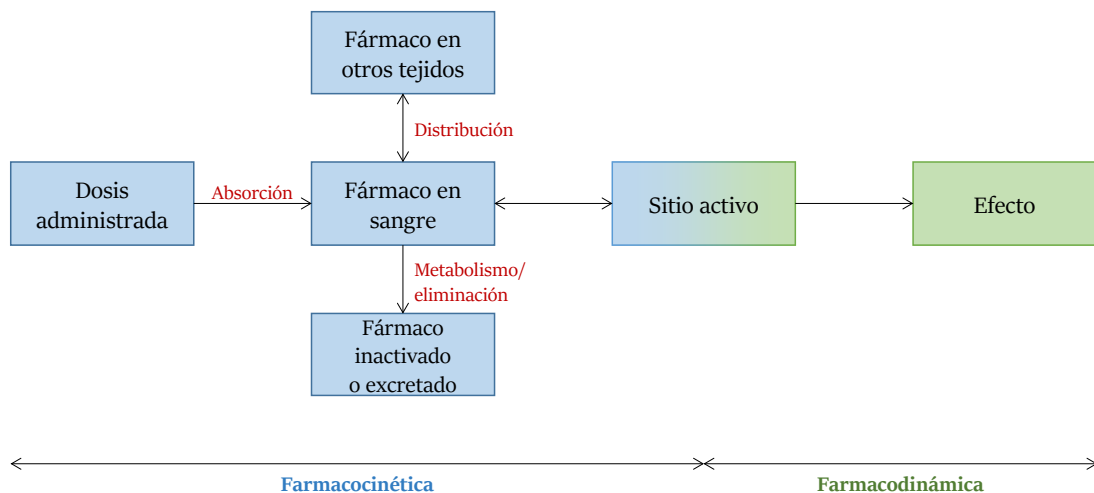


Figura 6. Esquema de los procesos involucrados en la farmacocinética y la farmacodinámica.

En el caso de los ISDs, factores como la edad del paciente, el tipo de trasplante y el tiempo transcurrido desde que se llevó a cabo, entre otros, pueden influir en la

interpretación de la relación farmacocinética y farmacodinámica.^{61,97} Esto se traduce en la observación de grandes variabilidades en la concentración del fármaco entre diferentes pacientes, e incluso para un mismo paciente con el tiempo.⁹⁸ Es por ello que se requiere disponer de métodos de análisis que permitan individualizar la terapia, para poder cuantificar y predecir las concentraciones y respuestas de la medicación y diseñar regímenes seguros y efectivos.⁹⁹

Con el paso de los años se han implementado numerosos métodos analíticos y protocolos de control para la realización de los estudios de TDM que permitan farmacoterapias más eficaces. Por ejemplo, la vigilancia farmacodinámica estudia el efecto biológico de un medicamento en su lugar de acción. Este tipo de vigilancia se puede realizar con los inhibidores de la calcineurina FK506 y CsA, evaluándose el efecto biológico al medir directamente la actividad fosfatasa de la calcineurina,¹⁰⁰ o la reducción de la expresión génica del factor nuclear de los genes reguladores de las células T activadas.^{101,102} El principal inconveniente de este tipo de monitorización es que se trata de ensayos más complejos que requieren tiempos de medida mayores que los necesarios para la medición directa del medicamento, empleando métodos cromatográficos o inmunoensayos.

Otra forma de llevar a cabo los estudios TDM es monitorizando los denominados biomarcadores terapéuticos. En este caso, se realizan mediciones bioquímicas para determinar el grado de toxicidad, eficacia o la farmacodinámica individual de un agente terapéutico. La vigilancia de estos biomarcadores permite definir con mayor precisión los intervalos terapéuticos, ya que se obtienen medidas integradas de las especies biológicamente activas, no solo del fármaco original sino también de sus posibles metabolitos. Un ejemplo de biomarcador terapéutico sería la medida de la actividad de la IMPDH para el control del MPA (apartado 1.3.1).¹⁰³

Otra área de investigación que está emergiendo es la farmacogenética, que estudia la influencia de los factores genéticos en la eficacia de los medicamentos.¹⁰⁴ Basándose en los polimorfismos de las enzimas metabolizadoras, los transportadores y/o los receptores, se puede llegar a predecir el efecto de la terapia sobre el paciente.¹⁰⁵ Un ejemplo significativo es el caso de los tratamientos con inmunosupresores

metabolizados por la familia de los citocromos P-450, como el FK506, donde los polimorfismos del CYP3A5 se producen por variaciones significativas entre los alelos. Según el genotipo que presente, el paciente va a metabolizar más rápidamente o más lentamente el fármaco, y por ello necesitarán dosis mayores o menores, respectivamente, para tener la misma concentración de FK506.^{106,107}

1.4.2. Tiempo de monitorización en el TDM

El rechazo del órgano puede producirse en cualquier momento después del trasplante, por lo que el paciente precisará tomar de por vida los ISDs. Estos tratamientos requieren una monitorización y regulación periódica a fin de prevenir los efectos supra- y subterapéuticos. Debido a que no es común hacer mediciones en continuo, la toma de muestra puede realizarse en diferentes momentos una vez el paciente tiene un nivel estable de medicación en el organismo. Con esos datos y empleando modelos estadísticos, basados en la farmacocinética y farmacodinámica del ISD, se pueden predecir cuales son las dosis necesarias para la individualización de la terapia (**Figura 7**).^{107,108}

- *Nivel valle o C_0* : este método mide la concentración del medicamento justo antes de la administración de la siguiente dosis; en este punto es cuando se obtienen los niveles de concentración más bajos del ciclo y se considera el momento más reproducible. Tan solo se usa una muestra, por lo que proporciona sólo una estimación de los niveles del fármaco durante el tiempo de administración. Sin embargo, evita la necesidad de que los pacientes esperen en el hospital para que se tomen múltiples muestras.

- *Área bajo la curva (AUC, del inglés *Area under the curve*)*: se toman entre 8 y 12 muestras seriadas durante un periodo de 12 h, pudiendo predecir así la concentración del fármaco después de cada dosis. Con todos estos datos se pueden obtener los perfiles farmacocinéticos y gestionar de forma efectiva la administración del fármaco e individualizar el tratamiento. Aunque se mejoran las limitaciones del C_0 , esta monitorización requiere mucho tiempo para la toma de muestras y los costes son elevados.

- *Área bajo la curva abreviada*: el número de muestras que se toman, entre 2 y 4, y el intervalo de tiempo (4 h) son menores que en el método anterior (AUC),¹⁰⁹ lo que se traduce en una reducción notable de los costes, aparte de ser más cómodo para el paciente.

- C_2 : en este caso el análisis se reduce a una única muestra, recogida 2 h después de la administración del fármaco. La vigilancia C_2 se utiliza principalmente para monitorizar los niveles de CsA.^{6,81,110,111} Al tratarse de un muestreo único, el tiempo de administración y muestreo tienen que estar bien controlados para conseguir una medición exacta de la concentración del medicamento.

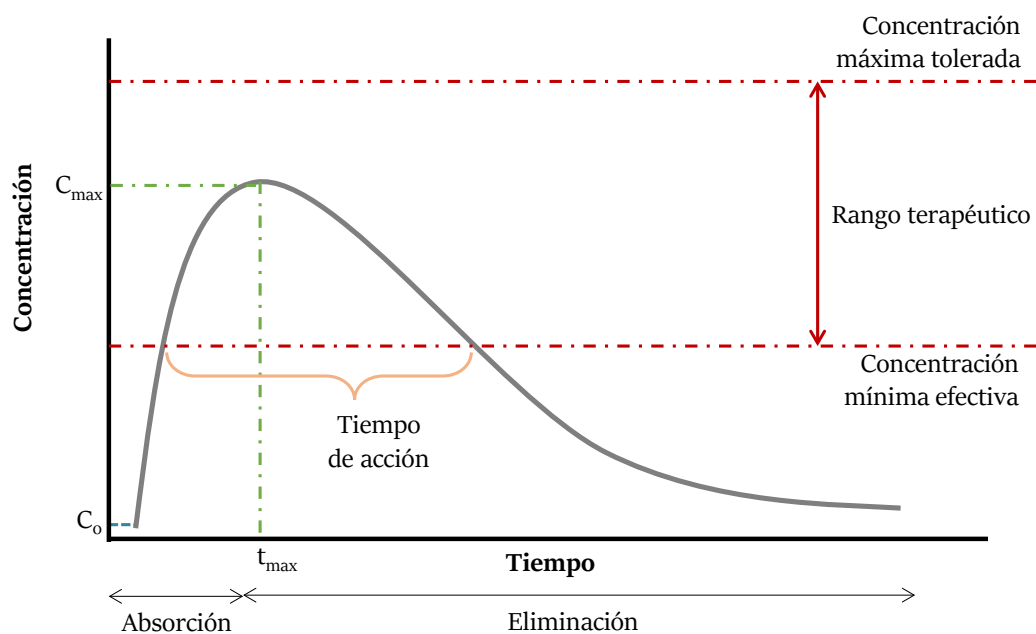


Figura 7. Curva de concentraciones respecto al tiempo tras la administración del fármaco.

2. Biosensores y bioensayos

2.1. Biosensores

En los años 60, los biosensores iniciaron su desarrollo y comercialización orientados principalmente a aplicaciones clínicas y de impacto bioquímico. Desde entonces se ha producido un crecimiento vertiginoso en su desarrollo, convirtiéndose en una de las áreas de mayor interés dentro de la Química Analítica. Gracias a su cómodo manejo, facilidad de automatización, corto tiempo de análisis, bajo coste y capacidad de integración en sistemas de control clínico o industrial, los biosensores son muy versátiles para su aplicación en diversos campos, destacando el entorno clínico, alimentario, medioambiental e industrial.

Por otro lado, la irrupción de la nanotecnología ha hecho posible el desarrollo de dispositivos más sofisticados y con mejores prestaciones, abriendo un abanico de nuevas posibilidades. Esta miniaturización ha demostrado ser beneficiosa, entre otros aspectos, porque se reduce el consumo de reactivos, incluido el volumen de la muestra, y se suele mejorar la relación señal/ruido.¹¹²

2.1.1. Consideraciones generales: definición y clasificación

La IUPAC, en su “Libro de Oro”,¹¹³ define un biosensor como “un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células completas para detectar analitos, generalmente mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas.”

Un biosensor consta de dos partes bien diferenciadas (**Figura 8**): 1) el elemento biológico de reconocimiento, encargado de transformar la información química en una forma de energía; y 2) el transductor, encargado de transformar dicha energía en una señal analítica medible. En algunos casos, se puede encontrar entre ambas partes un separador físico.

Las características fisicoquímicas del analito van a determinar el material biológico de reconocimiento más adecuado para su detección. De hecho, si se dispone

del receptor adecuado, esta tecnología permite detectar prácticamente cualquier sustancia y aplicarse en cualquier ámbito.

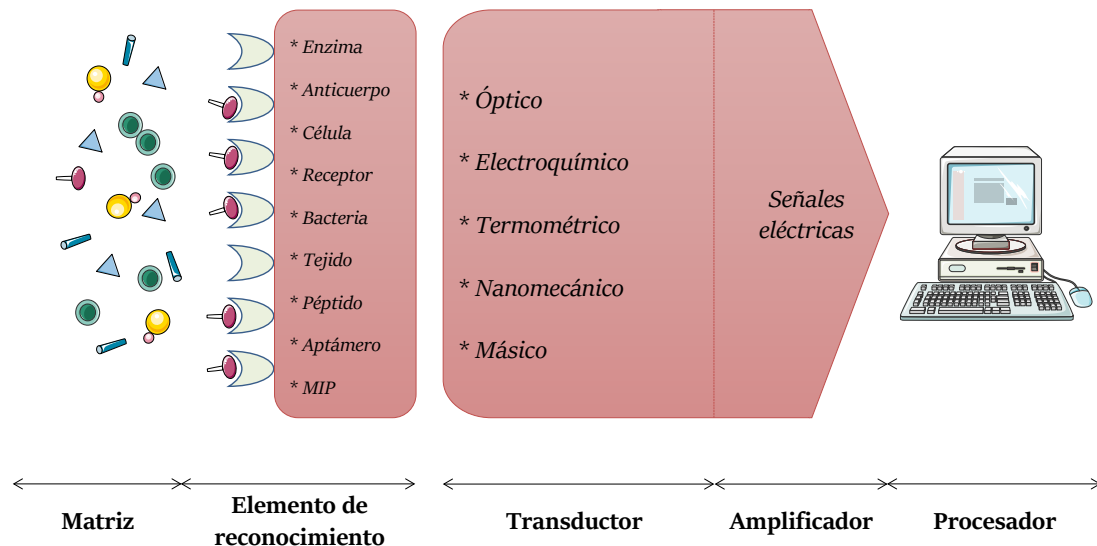


Figura 8. Componentes y mecanismo de funcionamiento de un biosensor.

Como se ha indicado anteriormente, los biosensores se aplican en múltiples y muy diversas áreas. En todas ellas es recomendable que se cumplan las siguientes características:¹¹⁴

- *Elevada selectividad*: es deseable que un biosensor sea capaz de discriminar entre especies químicamente semejantes. Esto se consigue gracias al empleo de elementos de reconocimiento específicos.

- *Elevada sensibilidad*: se requieren límites de detección lo más bajos posibles, habitualmente concentraciones muy por debajo del intervalo milimolar, ya que por lo general, las sustancias analizadas tienen efectos nocivos en la salud a muy bajas concentraciones.

- *Reutilizable*: que permita determinaciones consecutivas y que el tiempo empleado en regenerarlos sea mínimo, inferior a unos minutos.

- *Tiempo de análisis corto*: es conveniente que sea lo menor posible, o incluso que puedan trabajar en tiempo real sin necesidad de tratamiento de muestra previo.

- *Elevado tiempo de vida*: determinado por la estabilidad del elemento de reconocimiento. Debe ser lo mayor posible teniendo en cuenta la aplicación y el periodo de almacenamiento. En el caso de los elementos biológicos, estos suelen tener una vida útil corta.

- *Sencillez de manejo*: de modo que pueda ser empleado por cualquier persona, incluso sin estar cualificada.

- *Capacidad de automatización y miniaturización*: permitiendo su incorporación en sistemas en línea.

- *Pequeños y portátiles*: que puedan transportarse fácilmente para llevar a cabo medidas de campo.

- *Bajo coste*: minimizado al fabricarse a gran escala; si adicionalmente presenta pocos requerimientos operativos se reducen también los costes de mantenimiento.

- *Multianalito/multimuestra*: esta capacidad permite el análisis simultáneo de diferentes sustancias en una misma muestra, o medir diferentes muestras al mismo tiempo.

Los biosensores se pueden clasificar atendiendo a numerosos criterios, ya sea por el elemento de reconocimiento empleado, el mecanismo de interacción, el tipo transductor o el método de detección, entre otros.¹¹⁴

Teniendo en cuenta el método de detección, los biosensores se pueden clasificar en *directos*, cuando la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento no requiere de materiales adicionales que permitan su monitorización; o *indirectos*, cuando es necesario emplear un marcador cuya señal esté relacionada con la concentración de analito.

Según el mecanismo de interacción que se produce entre el analito y el elemento de reconocimiento biológico se puede distinguir entre los biosensores de *afinidad* y los biosensores *catalíticos*. Mientras que los primeros se basan en la interacción específica entre el analito de interés y el elemento de reconocimiento (ej. anticuerpo), los últimos se basan en el empleo de biomoléculas que catalizan reacciones químicas, como las

enzimas o las ribozimas, en las que intervienen uno o varios sustratos para generar uno o varios productos. Los biosensores catalíticos pueden emplearse para detectar la presencia del sustrato(s) o, de forma indirecta, para detectar sustancias que inhiben selectivamente la actividad del biocatalizador.

Los biosensores también se clasifican atendiendo al tipo de elemento de reconocimiento empleado en la fabricación del dispositivo. Gran parte de los procesos bioquímicos que tienen lugar en los organismos a nivel celular son producto de interacciones específicas que sientan las bases para el desarrollo de cualquier biosensor. Los elementos de reconocimiento biológico pueden ser de origen *natural*, obtenidos a partir de organismo vivos, como por ejemplo anticuerpos, enzimas, células, receptores o tejidos. También pueden ser elementos de reconocimiento *biomimético*, que actúan de forma semejante a sus homólogos naturales, aunque su origen es artificial. Algunos ejemplos de éstos serían los aptámeros, polímeros de impronta molecular, péptidos, nanoenzimas, etc. Hoy en día, las enzimas y los anticuerpos son los elementos de reconocimiento más utilizados, si bien la elección del elemento de reconocimiento dependerá siempre de la sustancia a determinar, así como del tipo de muestra.

Otra alternativa para clasificar los biosensores es en función del tipo de transductor que se emplea en el dispositivo. Como se ha indicado anteriormente, el transductor es el encargado de convertir la variación de las propiedades fisicoquímicas producidas en la interacción del elemento de reconocimiento con el analito en una señal que será amplificada por los componentes eléctricos del sensor. Según sea la naturaleza de esta señal, los biosensores pueden clasificarse en:^{115,116}

- *Ópticos*: aquellos biosensores basados en la variación de las propiedades de la radiación electromagnética, ya sea absorbancia, reflectancia, luminiscencia, índice de refracción o dispersión de la luz.

- *Electroquímicos*: se fundamentan en la movilidad de iones o en la difusión de especies electroactivas. Se subdividen en voltamperométricos, potenciométricos, impedimétricos, o conductimétricos.

- *Termométricos*: basados en cambios de temperatura generados por una reacción química.

- *Másicos*: también denominados piezoeléctricos o gravimétricos. Se basan en la detección directa de cambios de masa al exponer un material piezoeléctrico a un campo electromagnético.

- *Nanomecánicos*: basados en cambio de la deflexión y/o frecuencia de resonancia de un transductor, sumergido en un líquido, al interactuar el analito con el elemento de reconocimiento.

De forma común, los biosensores pueden clasificarse en tres grupos según la configuración de uso: *desechables*, *semicontinuos* o *continuos*. Tanto en los semicontinuos como en los continuos, se suele trabajar con una inyección constante de muestra y la monitorización se realiza de forma secuencial o a tiempo fijo. Ambos casos cumplen con la condición de reutilización. En cambio, los desechables, como los dispositivos de flujo lateral (ej. tiras reactivas de glucosa en sangre, de embarazo, tests serológicos) no cumplen con la condición de regeneración, por lo que muchos autores los consideran ensayos en lugar de sensores.

2.1.2. Biosensores ópticos

La presente Tesis Doctoral se centra en el empleo de transductores ópticos para el desarrollo de los bioensayos propuestos. En las últimas décadas, los transductores ópticos son, junto con los electroquímicos, los más empleados en el desarrollo de sensores. Esto es debido a sus excelentes prestaciones, como su facilidad de miniaturización, biocompatibilidad, capacidad de multiplexado, la posibilidad de medir en remoto, o su inmunidad frente a interferencias electromagnéticas.¹¹⁷⁻¹¹⁹

En función de la naturaleza de la interacción producida entre la radiación y la materia, los biosensores ópticos se pueden subdividir en los grupos indicados a continuación:¹¹⁵

- *Absorción*: se basan en la absorción de la radiación electromagnética incidente por parte de un compuesto presente en el medio. En el caso de los biosensores la

absorción de fotones suele llevarse a cabo en la región UV-vis-NIR.¹²⁰ El compuesto responsable de esta variación puede ser el propio analito, un indicador presente en el medio que interacciona con la especie de interés, un análogo del analito que se encuentra marcado (con una etiqueta química o biológica), o el elemento de reconocimiento, el cual también puede estar marcado. Esta técnica es ampliamente utilizada para el desarrollo de biosensores, especialmente aquellos basados en medidas colorimétricas, por su simplicidad y facilidad de aplicación. Si bien la señal obtenida puede ser directa y se puede relacionar con la concentración de analito mediante la ecuación de Lambert-Beer,¹²¹ también puede obtenerse como resultado de una reacción de amplificación mediada, por ejemplo, por una enzima. Por sus características, los biosensores basados en medidas de absorción pueden emplearse para la detección visual (ej. ensayos de flujo lateral), o bien utilizando un espectrofotómetro,¹²² del compuesto de interés dependiendo de la longitud de onda a la que absorba y de su concentración.

- *Refracción y reflexión*: basados en la medida de las variaciones que se producen cuando la radiación que viaja por un medio alcanza el límite de otro medio. Cuando esto sucede, las ondas pueden propagarse por el nuevo medio modificando su dirección y velocidad (refracción) o bien, puede rebotar y volver al medio de procedencia (reflexión), de forma que la velocidad no varía.¹²³ Que se dé un fenómeno u otro va a depender del ángulo de incidencia y de los índices de refracción de ambos medios.

En el caso de la refracción podemos encontrar dos situaciones distintas (**Figura 9**): a) que la luz pase de un medio con menor índice de refracción a otro con mayor índice de refracción, de forma que el ángulo de refracción sea inferior al de incidencia y el rayo refractado se acerca a la normal; b) que se produzca el paso de un medio con mayor índice de refracción a otro con menor índice de refracción de forma que el rayo refractado se aleja de la normal.

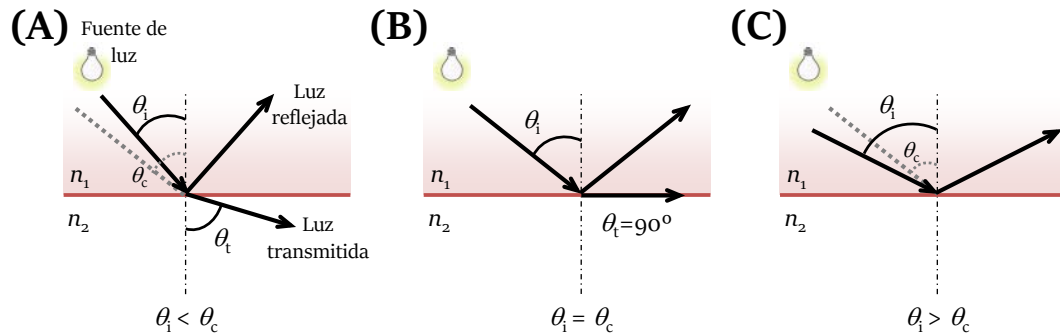


Figura 9. Fenómeno de reflexión total interna (TIR). (A) En la interfase de dos medios de diferente índice de refracción, la luz incidente que viaja desde el medio de mayor índice de refracción al de menor índice es parcialmente refractada y parcialmente reflejada. El rayo de luz transmitida se desvía de la normal, de tal manera que el ángulo de salida es mayor que el ángulo incidente (reflexión interna). (B) El ángulo de salida alcanzará los 90° , para un ángulo de incidencia denominado ángulo crítico, θ_c . (C) Cuando el ángulo de incidencia es superior al θ_c , toda la luz es reflejada, fenómeno denominado TIR.

En el segundo de los casos, si se aumenta el ángulo de incidencia, el rayo refractado se va acercando a la superficie de separación entre los medios de forma que, para cierto valor denominado ángulo crítico, el rayo refractado se propaga rasante a dicha superficie y la radiación transmitida es prácticamente nula (**Figura 9**).¹²³

Cuando el ángulo de incidencia es superior al ángulo crítico, ocurre el fenómeno denominado reflexión total interna (TIR, del inglés *total internal reflection*). En estas condiciones el haz incidente se refleja completamente en la superficie de separación entre ambos medios, quedando confinado en el que tiene mayor índice de refracción (**Figura 10**). Este es el fundamento de la transmisión de la luz en las guías de onda planas y la fibra óptica.¹²⁴

Cuando la transmisión de la radiación a través de la guía de onda se produce en condiciones de TIR, el campo electromagnético no queda confinado totalmente en el interior del núcleo, sino que una componente de la luz, denominada “onda evanescente”, que tiene la misma frecuencia que la radiación incidente, se extiende a las zonas limítrofes decayendo exponencialmente en intensidad con la distancia (100 – 300 nm) a la superficie.¹²⁵ Este campo interactuará con las especies que se encuentren cerca de la interfase entre los dos medios, aunque la zona más sensible para la detección se encontrará en la superficie de la guía de ondas, de forma que cualquier interacción molecular (analito-receptor) que tenga lugar dentro de la distancia de penetración del campo evanescente producirá cambios en las características de la luz

propagada por la guía de onda. Estos cambios son el principio de medida de los transductores ópticos basados en onda evanescente, y los biosensores que emplean este tipo de transducción se denominan biosensores de onda evanescente.

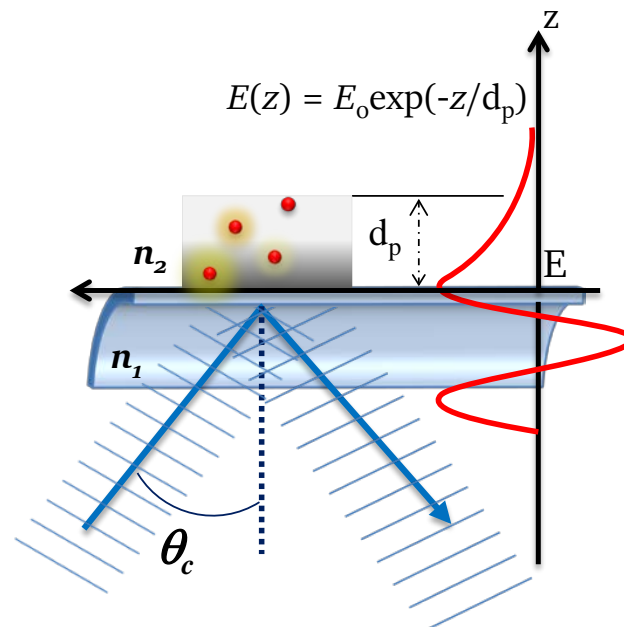


Figura 10. Transmisión de la radiación electromagnética en una fibra óptica por reflexión total interna. Amplitud del campo eléctrico, E , a ambos lados de la interfase núcleo/recubrimiento de una fibra óptica. La amplitud del campo eléctrico decae exponencialmente en el medio de menor índice de refracción (n_2 , recubrimiento), y la distancia de penetración, d_p , depende de, λ , θ , n_1 y n_2 . Adaptada de referencia 124.

Por ejemplo, si la radiación es absorbida por la especie de interés y se induce su fluorescencia, hablaremos de sensores de fluorescencia de reflexión total interna (TIRF),¹²⁶ y la intensidad de la emisión estará relacionada con las concentraciones del analito. En cambio, si lo que se compara es la intensidad de radiación incidente con la reflejada, la atenuación de la señal se deberá a la absorción de luz por parte del material presente en la superficie y se tratará de un sensor de reflectancia total atenuada (ATR, del inglés *attenuated total reflection*).¹²⁷ Por otro lado, si en la interfaz se encuentra una capa de un metal-dieléctrico, la onda evanescente provocará que los electrones libres del metal entren en resonancia al excitarlos. Estas oscilaciones de los electrones se denominan plasmones y dependerán del índice de refracción del medio adyacente, de forma que cualquier variación producida en el mismo tras la interacción con el analito afectará al índice de refracción y, en consecuencia, a la resonancia de los plasmones. Los sensores basados en este efecto se denominan sensores de resonancia

de plasmón superficial (SPR, del inglés *surface plasmon resonance*), y permiten medir de manera directa, sin la necesidad de marcaje, y a tiempo real, interacciones ligando-receptor o antígeno-anticuerpo.¹²⁸

En los sensores interferométricos el haz de luz incidente se divide en dos caminos iguales, uno de ellos sirve como referencia mientras que el otro interactúa con una zona sensora. Ambos caminos se recombinan generándose un patrón de interferencias que depende de las diferencias existentes entre los índices de refracción de ambas ramas y de la longitud de la zona sensora. Cualquier variación producida en el índice de refracción de la zona sensora tras la interacción con el analito originará un cambio en el patrón de interferencia que puede relacionarse con su concentración de forma directa, sin necesidad de marcadores.¹²⁹

- *Luminiscencia*: basados en la medida de la intensidad de la radiación luminosa (UV-vis-NIR) emitida por relajación de un estado electrónico excitado, generado de distintas maneras, tales como la absorción de un fotón (fotoluminiscencia), una reacción química (quimioluminiscencia), un proceso bioquímico en un organismo vivo (bioluminiscencia), o una corriente eléctrica (electroluminiscencia), entre otros. Dentro de la fotoluminiscencia se incluye la fluorescencia molecular que, junto con el SPR, es la técnica más utilizada para el desarrollo de biosensores ópticos. Las medidas pueden basarse en la monitorización de la intensidad de emisión, de su cinética (tiempo de vida de emisión), del espectro de emisión o de la anisotropía (polarización).^{130,131}

La señal luminiscente puede ser intrínseca al analito de interés, o bien deberse al empleo de indicadores cuya emisión se modifica en presencia del analito. Alternativamente, la intensidad de luminiscencia del indicador puede disminuir en presencia de algunos analitos, en un proceso conocido como desactivación de la luminiscencia (*quenching*). Este proceso fotoquímico reversible puede producirse debido a la desactivación del estado excitado como consecuencia de una transferencia de energía, electrónica o protónica a/desde el analito (**Figura 11**).¹³¹

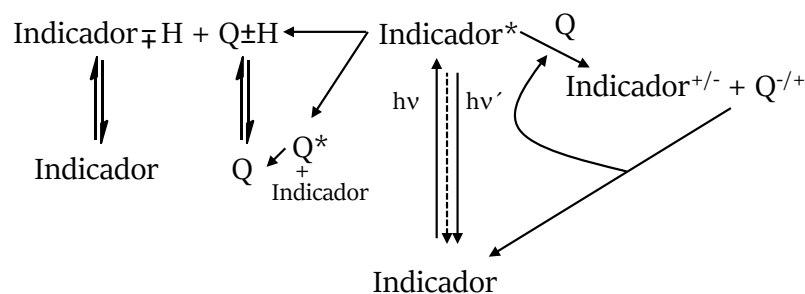


Figura 11. Principios de la detección de luminiscencia reversible mediante procesos fotoquímicos de desactivación (transferencia de electrones, de energía o de protones). El indicador va a ser una molécula luminiscente, Q es la especie de desactivación y la flecha punteada representa los procesos de desactivación no radiativa. La intensidad de la luminiscencia (y el tiempo de vida del estado excitado) del indicador disminuye en presencia del desactivador. Adaptado de la referencia 131.

Los indicadores luminiscentes no suelen experimentar todas las vías de desactivación del estado excitado descritas anteriormente, y su estructura se puede modificar para potenciar selectivamente alguna de ellas, por ejemplo, seleccionando el potencial redox adecuado en el estado excitado, alterando el espectro de emisión o incluyendo la presencia de grupos funcionales sensibles al pH. Uno de los mecanismos de medida más empleados para el desarrollo de biosensores ópticos se basa en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, del inglés *Förster resonance energy transfer*) entre un fluoróforo y un indicador sensible al analito cuya banda de absorción solapa significativamente con la de emisión del primero. El compuesto de interés interacciona de forma reversible con el indicador, modificando la banda de absorción con la consiguiente variación en la eficiencia de la transferencia de energía desde el fluoróforo. La aplicación de este principio de medida permite el desarrollo de biosensores basados tanto en medidas de intensidad como de tiempo de vida de emisión. La eficiencia del FRET depende del grado de solapamiento espectral, de la distancia entre las moléculas y de la orientación relativa de las mismas.¹³²

2.2. Retos en la detección de moléculas con bajo peso molecular

Se denominan moléculas pequeñas aquellas con un peso molecular inferior a 1000 Da.¹³³ Esta definición engloba a un gran número de compuestos químicos, de origen natural o sintético, los cuales pueden ser relevantes desde el punto de vista medioambiental, biológico o farmacológico. Existen un sinnúmero de biosensores y ensayos

bioanalíticos diferentes para moléculas pequeñas, incluidos algunos ISDs como el MPA (~320 Da) y el FK506 (~804 Da).

Una de las limitaciones a la hora de desarrollar inmunosensores para detectar estas moléculas es que se trata de analitos para los que es complicado generar anticuerpos debido a que las moléculas de bajo peso molecular no estimulan el sistema inmunitario y es necesario ligarlas a una proteína transportadora para generar el inmunógeno.¹³⁴ Por otra parte, los compuestos como los ISDs afectan al sistema inmune suprimiendo la producción de anticuerpos. Una alternativa para el desarrollo de inmunosensores para la determinación de estos compuestos es el empleo de anticuerpos recombinantes, que ya se han descrito para la detección de MPA.¹³⁵

Por otro lado, el empleo de ensayos de tipo competitivo requiere la funcionalización del analito, bien para su inmovilización o para su marcaje con la sonda seleccionada. El rendimiento de estas etapas es fundamental para el éxito del ensayo y, además, es importante confirmar que la derivatización del antígeno no afecta al biorreconocimiento del mismo.¹³³ Para solucionar este problema, en los últimos años, se ha descrito el empleo de péptidos miméticos (mimopeptidos) que se unen al mismo parátipo del anticuerpo que el analito y que se pueden funcionalizar, por ejemplo, con biotina o con proteínas luminiscentes empleando técnicas de biología molecular, de forma que se evitan las limitaciones relacionadas con la conjugación del analito.¹³⁶ Nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente el desarrollo de un biosensor para la determinación de MPA empleado un péptido mimético cíclico, seleccionado mediante la técnica de despliegue de péptidos en fagos (*“phage display”*), fusionado a una proteína luminiscente (Nanoluc[®]) y basado en un inmunoensayo de tipo competitivo.¹³⁷

3. Métodos analíticos para la determinación de inmunosupresores

Desde el inicio del empleo de los ISDs se han desarrollado numerosos métodos analíticos para su determinación en fluidos biológicos, para TDM o para estudios farmacocinéticos. Estos medicamentos se encuentran a bajas concentraciones en las muestras, por lo que su determinación requiere del empleo de métodos exactos, precisos, sensibles, robustos y con una elevada selectividad.

A continuación, se recoge una selección de los trabajos más representativos, publicados en los últimos 10 años, para el análisis de ácido micofenólico, tacrolimus y ciclosporina A, los ISDs objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral. Se ha hecho especial hincapié tanto en el tratamiento de muestra como en el análisis. Los métodos se han clasificado en dos grupos: cromatográficos y no cromatográficos.

3.1. Tratamiento de muestras: métodos de extracción, purificación y preconcentración

El tratamiento de la muestra es la primera etapa de un método analítico, siendo la más crítica a la hora de cuantificar cualquier analito, especialmente en muestras complejas. Debido a esta complejidad, en muchas ocasiones, la sensibilidad y la robustez del método de análisis se ven limitadas.

Por lo general, las muestras de suero y plasma suelen ser las idóneas a la hora de realizar la monitorización de medicamentos. Si bien el MPA suele monitorizarse en suero o plasma, para los estudios farmacocinéticos de la gran mayoría de ISDs (tacrolimus, ciclosporina, sirolimus y everolimus) prefiere emplearse la sangre entera. La principal razón es la distribución de estos analitos en la sangre y su baja presencia en el plasma sanguíneo. Aproximadamente, sólo un 15% de FK506 se encuentra en plasma y el resto está distribuido en el resto de la sangre. En el caso del sirolimus, el 95% se encuentra unido a eritrocitos y solo un 3% está libre en plasma. Por otro lado, la ciclosporina no solo tiene el inconveniente de que únicamente un 33–47% se encuentra en el plasma, sino que la concentración puede decrecer hasta un 12–14% al aumentar la concentración de eritrocitos a un 10%. En cambio, el MPA se encuentra

casi exclusivamente en el plasma, y su distribución es independiente de la temperatura o la concentración.³⁰

Las muestras de sangre entera se obtienen habitualmente por venipuntura en tubos con EDTA, pero un método alternativo menos invasivo son las manchas de sangre seca (DBS, del inglés *dried blood spot*). Con este método los pacientes pueden extraerse sangre capilar con una lanceta, aplicarla sobre papel de muestreo y, tras dejarla secar, enviarla a analizar. Este tipo de muestreo precisa de un volumen de muestra pequeño (10 – 50 µL) y reduce las visitas de los pacientes a los centros médicos. Estudios de validación comparando DBS con sangre extraída de forma tradicional han demostrado que se trata de una alternativa válida para la monitorización de ISDs.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Asimismo, se ha evaluado que la estabilidad de los ISDs en estos soportes es de 34 días a 32 °C para el everolimus¹⁴¹ y de al menos 5 días a temperaturas de hasta 60 °C para el FK506 y la CsA.¹⁴⁰ Sin embargo, una gran desventaja que debe ser corregida es el efecto de los hematocritos, los cuales tienen un efecto directo en la viscosidad y fluidez de la sangre, y al darse niveles altos, la distribución de la muestra en el papel es deficiente.¹⁴²

Aunque el TDM rutinario se practica usando muestras de sangre entera obtenidas por venipuntura o derivados, hay diferentes estudios donde detectan estos analitos en otras matrices biológicas como saliva,¹⁴³⁻¹⁴⁵ córnea,¹⁴⁶ orina,¹⁴⁷ líquido cerebroespinal¹⁴⁸ o leche materna,¹⁴⁹⁻¹⁵¹ entre otros.¹⁵²

El mayor campo de estudio de los ISDs es el médico, pero no hay que olvidar que algunos de ellos provienen de diferentes hongos y por ello son considerados micotoxinas. Sin embargo, los niveles a los que se suelen encontrar en los alimentos son inferiores a las concentraciones empleadas en el ámbito terapéutico por lo que no suponen un gran riesgo para la salud. Es posible encontrarlos en quesos,¹⁵³ maíz^{154,155} y arroz, entre otros.¹⁵⁶

Una de las etapas cruciales a la hora de desarrollar un método analítico para el análisis de fármacos, u otras sustancias, en muestras biológicas es la preparación de la muestra, ya que condiciona tanto la sensibilidad como la robustez del mismo. Por

ejemplo, la complejidad de algunas matrices, como la orina, plasma o sangre es crítica ya que presentan un alto contenido en sales, fosfolípidos o glóbulos rojos, entre otros componentes.¹⁵⁷

Como ya se ha comentado, la muestra biológica más utilizada habitualmente para la determinación de los ISDs es la sangre, ya que es relativamente fácil de obtener y aporta una gran riqueza de parámetros bioquímicos. Dependiendo del ISDs estudiado, la sangre extraída suele fraccionarse en sus componentes fundamentales: plasma, suero o células. Tanto la extracción de la sangre, como su posterior tratamiento, deben realizarse en condiciones óptimas y responder a las necesidades del análisis y la instrumentación a utilizar.

Para cuantificar la cantidad total de ISDs en las muestras biológicas es necesario romper las interacciones fármaco-proteína. La precipitación de proteínas (PP) es un método simple que permite su desnaturalización y eliminación eficiente, separando la materia orgánica de los analitos de interés y facilitando el proceso de extracción/purificación realizado posteriormente.

Los tratamientos de desproteínización para biomatrices están basados en el empleo de disolventes orgánicos (metanol (MeOH),^{72,158,159} acetonitrilo (MeCN),^{160,161} acetona,¹⁶² o una mezcla de ellos en diferentes proporciones), ácidos (ácido tricloroacético, ácido perclórico, ácido fosfórico) y/o sales (sulfato amónico, cloruro de aluminio, sulfato de zinc).¹⁶³ En el caso de los ISDs, el tratamiento más extendido se basa en el uso de MeOH, ya que permite obtener un sobrenadante más limpio con pérdidas despreciables del fármaco a determinar. En algunos casos, el disolvente orgánico se combina con ZnSO₄, ya que se ha demostrado¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ que la presencia de cationes Zn (II) desestabiliza la estructura de algunas proteínas al formarse complejos insolubles metal-proteína. En el caso de las células sanguíneas se une a las proteínas de membrana de los glóbulos rojos provocando que precipiten y, en consecuencia, que las células se lisen favoreciendo la liberación de los analitos. Alternativamente, se pueden realizar desproteínizaciones empleando membranas de ultrafiltración (UF) en las que las macromoléculas de elevado tamaño, que no pasan a través de los poros, son retenidas mientras que las de pequeño peso molecular, como los ISDs, atraviesan la

membrana porosa. Este método se ha utilizado con éxito para el aislamiento de MPA de plasma y suero sanguíneo.^{167,168}

Los métodos de extracción y purificación más comunes empleados para el análisis de ISDs son la extracción en fase sólida (SPE, del inglés *solid phase extraction*), ya sea en modo *off-line* u *on-line*,¹⁶⁹ y la extracción líquido-líquido (LLE, del inglés *liquid-liquid extraction*).¹⁷⁰ Los adsorbentes más empleados en SPE son alquil-sílices (C₁₈ y C₈)^{169,171} y materiales poliméricos (poli(estireno-co-divinilbenceno) (PS-DVB)¹⁷²). Sin embargo, estos materiales no son selectivos a los ISDs lo que ha facilitado el desarrollo y comercialización de sorbentes de afinidad, como inmunoabsorbentes o polímeros de impronta molecular (MIPs, del inglés *molecularly imprinted polymers*) para la extracción de MPA^{159,173-175} y CsA.^{176,177}

Otra posibilidad es el uso de sistemas de extracción miniaturizados, que permiten procesar tamaños de muestra más pequeños y reducir tanto el coste del análisis como los desechos generados. La microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS, del inglés *microextraction by packed sorbent*) es una versión reducida del SPE empleando 1 – 2 mg de sorbente empaquetados en jeringas. Al igual que el SPE puede usarse también en línea o en discontinuo y comparten el mismo tipo de fases estacionarias. Este tipo de extracción fue empleado por Said y col.⁷⁰ para cuantificar CsA, FK506, Everolimus (Eve) y Sir.

La LLE es un método tradicional en la preparación de muestras para bioanálisis. En el análisis de matrices biológicas para la determinación de ISDs es frecuente el uso de MeOH, MeCN, acetona o mezclas de disolventes orgánicos como extractantes.¹⁷⁸ Las principales ventajas de esta técnica son su simplicidad y bajo coste, aunque el alto grado de manipulación de la muestra, formación de emulsiones y elevados tiempos de ejecución hacen que cada día sea menos utilizado.

La metodología QuEChERS (del inglés *quick, cheap, effective, rugged and safe*) consiste en un proceso de extracción en fase sólida dispersiva. Se realiza una primera etapa de extracción seguida de una etapa de limpieza, eliminando de esta forma el exceso de agua y los contaminantes de la muestra. Por el momento este método de

análisis solo se ha empleado para la extracción de azatioprina en muestras de agua¹⁷⁹ y de MPA y FK506 en sedimentos.¹⁸⁰

Una de las debilidades de las herramientas analíticas es la falta procedimientos automatizados de preparación de muestra. En el caso de muestras de sangre, la dificultad para implementar protocolos autónomos se ve dificultada por la rápida sedimentación de las células sanguíneas, problema que tan solo puede solventarse usando sistemas de agitación o mediante ciclos de aspiración/dispensación.^{171,181,182} En este sentido, Van den Bassche y col.¹⁸³ evaluaron el uso de un kit con micropartículas paramagnéticas para lisar y eliminar las proteínas de muestras de sangre entera para el análisis de Eve, siendo comparable a la PP. Todo el precipitado se recolecta mediante la separación magnética por lo que no es necesario centrifugar, de forma que el sistema es fácilmente automatizable.

Otra técnica de preparación de muestra menos empleada en el análisis de ISDs es la cromatografía de flujo turbulento (TFC, del inglés *turbulent flow chromatography*),¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ que permite llevar a cabo la extracción en línea. La TFC combina las tradicionales fases estacionarias con la exclusión molecular, separando las macromoléculas de los analitos de interés.¹⁸⁷ El consumo de disolventes con esta técnica es elevado; sin embargo, presenta la ventaja de ser fácilmente automatizable, lo que disminuye la manipulación de la muestra y el tiempo de análisis.

3.2. Métodos cromatográficos

Las técnicas cromatográficas son la base de la mayoría de los métodos aplicados a la monitorización terapéutica de inmunosupresores.¹⁸⁸

3.2.1. Cromatografía líquida

En las últimas décadas la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *high-performance liquid chromatography*) ha sido la técnica que más se ha empleado para el análisis de estos compuestos. Los inmunosupresores tienen carácter apolar, por lo que en la separación cromatográfica se realiza en fase inversa, empleando columnas basadas en soportes de sílice o resinas poliméricas, destacando la

fase C₁₈ y, en menor medida, C₈, fenil-hexil¹⁵⁸ o ciano.¹⁸⁹ La detección y cuantificación de los inmunosupresores se realiza empleando como detectores: espectroscopía ultravioleta de onda variable (DAD, del inglés *diode array detector*) o fija (UV), fluorescencia (FLD, del inglés *fluorescence light detector*) y espectrometría de masas (MS, del inglés *mass spectrometry*).

El empleo de fases estacionarias de menor tamaño ha dado lugar a la cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC, del inglés *ultra-performance liquid chromatography*) que permite reducir el tiempo de análisis, además de mejorar la sensibilidad y resolución de la separación cromatográfica.¹⁹⁰ La UPLC acoplada a espectrometría de masas se ha aplicado al análisis de varios inmunosupresores.^{72,172,179,190,191}

Los inmunosupresores MPA, CsA, Sir, Eve presentan bandas de absorción típicas entre 220 nm y 280 nm, mientras que FK506 sólo absorbe radiación UV alrededor de los 190 nm. En todos los casos, el uso de detectores UV y DAD son útiles para su cuantificación, aunque su identificación no puede realizarse a partir del espectro UV-vis de éstos debido a la baja sensibilidad y selectividad. Además, la mayoría de las sustancias endógenas presentes en las matrices biológicas absorben fuertemente en esta región, lo que requiere la implementación de métodos de tratamiento de muestra extremadamente eficaces que, en la mayoría de los casos, no son viables.⁹⁵

La detección FLD no es habitual para el análisis de inmunosupresores ya que la ausencia de grupos fluorescentes en su estructura molecular hace necesaria una derivatización previa.¹⁹² Una excepción es el MPA, que presenta una fluorescencia dependiente del pH y puede alcanzarse la sensibilidad adecuada para su determinación cuando se emplean fases móviles alcalinas.^{147,193-195}

La utilización de detectores de MS permite no sólo conseguir límites de detección y cuantificación muy bajos, sino también una gran selectividad, lo que es esencial debido a las bajas concentraciones que deben cuantificarse en los estudios de TDM. Por ello, han sustituido en gran medida a los sistemas con detección UV o FLD. La fuente de ionización más empleada en MS/MS es el electrospray (ESI) operando en modo

positivo, monitorizando las transiciones de masa del analito y el patrón interno. No obstante, para el análisis de ISDs se han empleado otras fuentes como la ionización a presión atmosférica (API, del inglés *atmospheric pressure ionization*), con los iones precursores como aductos de amonio ($[M+NH_4]^+$),¹⁶⁰ y la ionización química a presión atmosférica (APCI, del inglés *atmospheric pressure chemical ionization*), con iones precursores como moléculas protonadas ($[M+H]^+$), aductos de potasio ($[M+K]^+$) y aductos de sodio ($[M+Na]^+$).¹⁴⁸

La terapia inmunosupresora suele implicar la combinación de varios medicamentos, por lo que es importante analizar estos inmunosupresores de forma simultánea para evitar retrasos innecesarios y el coste asociado a la repetición del proceso analítico. El empleo de LC-MS/MS ofrece esta posibilidad. Sin embargo, la alta susceptibilidad de esta técnica al efecto matriz, que puede afectar a la sensibilidad y exactitud del método, condiciona a la realización de un tratamiento eficaz de la muestra para evitar tanto fenómenos de supresión como de aumento de la señal para los analitos de interés. Además, deben utilizarse patrones internos, en el caso de los ISDs los más extendidos son ISDs marcados isotópicamente, aunque también se emplean la ciclosporina D en la detección de la CsA¹⁹⁶ y la ascomicina para el FK506.¹⁹⁷

Aunque menos frecuentes, se pueden utilizar otros detectores acoplados a la separación cromatográfica. Un ejemplo es la detección electroquímica (ECD, del inglés *electrochemical detection*) que se ha empleado para la detección de Sir tras la aplicación de LLE en muestras de sangre.¹⁹⁸

Por otro lado, cuando se realiza la monitorización de los inmunosupresores también es importante determinar la presencia de metabolitos activos o tóxicos. El análisis simultáneo de los metabolitos isométricos activos M1, M2 y M3 del FK506 es un desafío por su similitud en la estructura y peso molecular al FK506. La aplicación de la fase móvil apropiada y de gradientes en LC-MS/MS permite su elución a diferentes tiempos y, con ello, su cuantificación.^{169,170} Tanto el MPA como la CsA y sus metabolitos principales se han determinado simultáneamente en sangre mediante HPLC-UV,^{199,200} HPLC-MS²⁰¹ y LC-MS/MS.²⁰²⁻²⁰⁴

El uso de procedimientos no estandarizados para la TDM puede dar lugar a diferencias en los resultados inter-laboratorios,²⁰⁵ por lo que se han empezado a comercializar diferentes kits (incluyen todos los reactivos necesarios para el análisis, así como la columna cromatográfica) para la TDM usando LC-MS y LC-MS/MS. Para evaluar la versatilidad de estos kits para medidas rutinarias, se han llevado a cabo estudios multicentro²⁰⁶ y se ha comprobado la idoneidad de estos. La adopción de estos materiales podría facilitar la armonización de las medidas de los inmunosupresores entre laboratorios.

Tabla 1. Resumen de las características analíticas de kits comerciales desarrollados para la determinación de ISDs en matrices biológicas mediante LC-MS/MS.

Kit	ISDs	Matriz	Tratamiento de muestra	LOD / LOQ (ng/mL)	Linealidad (ng/mL)	R (%)	Vol (µL)
ClinMass® Complete Kit (Recipe®)	CsA FK506 Sir Eve	WB	PP + SPE	0.011*/0.037** 0.004*/0.014** 0.073*/0.244** 0.126*/0.420**	0.037–2,000 0.014–80 0.244–80 0.420–80	90–100	100
ClinRep® HPLC Complete Kit (Recipe®)	MPA	P	PP	60/100**	100–40,000	95–105	100
ISDs LC-MS/MS Analysis Kit (Zivak®)	FK506 Sir CsA Eve	WB	PP + SPE	0.11/0.34 0.19/0.65 0.56/1.85 0.16/0.5	5–10 100–400 4–20 3–8	n.d.	150
DOSIMMUNE® (Shimadzu)	CsA Eve Sir FK506	WB	PP + SPE	≤ 5/n.d. ≤ 0.5/n.d. ≤ 0.5/n.d. ≤ 0.5/n.d.	≤ 3,000 ≤ 100 ≤ 100 ≤ 100	n.d.	n.d.
MassTox® ISDs kits (ChromSystems)	CsA Eve Sir FK506	WB	PP + SPE	n.d./5 n.d./0.5 n.d./0.5 n.d./0.5	< 2,000 < 80 < 80 < 80	n.d.	50
MassTox® MPA	MPA	S/P	n.d.	< 100/-	≤ 20,000	105–119	50
Waters MassTrak ISDs Kit	FK506	WB	PP + SPE	n.d./n.d.	3–30	90–110	n.d.

*LLOD; **LLOQ. CsA: ciclosporina A; Eve: everolimus; FK506: tacrolimus; ISDs: inmunosupresores; LLOD: límite inferior de detección; LLOQ: límite inferior de cuantificación; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; MPA: ácido micofenólico; n.d.: no descrito; P: plasma; PP: Precipitación de proteínas; S: suero; Sir: sirolimus; SPE: extracción en fase sólida; WB: sangre entera con EDTA.

En las **Tablas 1 y 2** se resumen las características analíticas de algunos kits comerciales y de los métodos cromatográficos descritos en la bibliografía.

3.2.2. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC, del inglés *gas chromatography*) se aplica muy excepcionalmente al análisis de inmunosupresores debido a la necesidad de derivatizar los analitos para aumentar su volatilidad.

La CG acoplada a un detector de MS se ha empleado para la determinación de MPA, usando LLE, seguida de una derivatización con *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) y trimetilclorosilano (TMCS).²⁰⁷ El efecto metabólico del tratamiento con CsA y el FK506 se ha estudiado en orina,^{208,209} realizando también una derivatización con BSTFA y TMCS antes del análisis por GC-MS. Por otro lado, Vinale y col.²¹⁰ emplearon BSTFA para derivatizar extractos de una cepa del hongo *Penicillium brevicompactum*, identificando en ellos el MPA como uno de sus metabolitos.

Böer *et. al*²¹¹ llevaron a cabo una pirólisis (Pyr, del inglés *pyrolysis*) acoplada a GC-MS para caracterizar FK506. La finalidad de esta técnica es el análisis cualitativo de los productos de la pirólisis. La muestra se somete a temperaturas entre 300 – 400 °C, produciéndose la división térmica de sus fragmentos periféricos, los cuales son introducidos directamente en el sistema cromatográfico. Los autores observaron una buena correlación entre las pérdidas de masa obtenidas por Pyr-GC-MS con la descomposición térmica obtenida en la termogravimetría dinámica. Otra aplicación de esta técnica ha sido el análisis de los aminoácidos presentes en hidrolizados de ciclosporina.²¹²

Tabla 2. Resumen de las características analíticas de métodos cromatográficos seleccionados descritos en la bibliografía para la determinación de ISDs

Análito	Matriz	Tratamiento de muestra	Técnica de análisis	LOD/LOQ (ng/mL)	Linealidad (ng/mL)	Recuperación (%)	Ref.
FK506 Sir Eve CsA MPA	WB (VAMS)	1) H ₂ O/MeOH 2) Cambio de medio	UPLC-MS/MS	0.1/0.5* 0.1/0.5* 0.15/0.5* 4/20* 15/75*	0.5–50 0.5–50 0.5–50 20–2,000 75–7,500	76.5–87 73.8–88.2 74.2–82.7 77.9–83.6 76.8–88.8	[213]
CsA (libre) MPA (libre)	Suero	1) Ultracentrifugación 2) LLE: Tampón citrato/ 1-clorobutano 3) Cambio de medio	HPLC-MS/MS	-/0.1* -/0.5*	0.1–10 0.5–100	-	[55]
Sir Eve FK506	WB	1) PP: ZnSO ₄ /MeOH 2) SPE <i>on-line</i> (C ₁₈)	HPLC-MS/MS	0.1/0.2* 0.1/0.2* 0.1/0.2*	0.2–29 0.2–23.2 0.2–23.1	-	[171]
MPA	Plasma	PP: MeOH	HPLC-MS/MS HPLC-MS GC-MS	-/500* -/50* -/50*	500–30,000 50–30,000 50–30,000	-	[207]
MPA (total) MPA (libre)	Plasma	Total: PP (MeOH) Libre: Ultrafiltración	HPLC-FLD	8/- -/5	50–40,000 5–1,000	94.5–98.3 94.3–98.2	[51]
FK506	Saliva	1) Sonicación 2) PP: MeCN	Lc-MS/MS	-/0.01*	0.01–1.6	94.5–103.6	[145]
CsA	WB	PP ZnSO ₄ :MeCN	UPLC-MS/MS	-/10*	10–1,000	33.1–37	[214]

Tabla 2. Continuación

Analito	Matriz	Tratamiento de muestra	Técnica de análisis	LOD/LOQ (ng/mL)	Linealidad (ng/mL)	Recuperación (%)	Ref.
MPA MPAG	Plasma y saliva	1) PP: Saliva: MeOH Plasma: MeOH: ZnSO ₄ (70:30, v/v) 2) Filtración	LC-MS	1/5 5/10	5–500 10–500	85	[144]
FK506 Eve CsA	WB	PP: MeOH: ZnSO ₄ (0.1 M) (50:50, v/v)	HPLC-DAD	0.56/1.7 0.08/0.24 7.6/23	2.1–63 2.4–200 36–1,250	102 99 104	[215]
CsA FK506 Sir	WB	1) PP: MeOH/ZnSO ₄ (4:1, v/v) 2) TFC (Fenil-hexil)	LC-MS/MS	1/4.5* 0.05/0.2* 0.1/0.4*	4.5–1,500 0.2–100 0.4–100	97 95 93	[185]
Sir	WB	1) PP: ZnSO ₄ /MeOH (80:20, v/v) 2) LLE: t-butil metil éter 3) Cambio de medio	HPLC-ECD	0.5/-	1–50	>90	[198]
MPA MPAG	Plasma	PP MeOH:MeCN (1:1, v/v)	UHPLC-UV	100/260* 150/250*	300–20,000 300–3,000	83–113 87–97	[178]
FK506	DBS (6 mm)	PP: MeOH y ultrasonidos LLE: <i>tert</i> -butil éter	LC-MS/MS	0.25/1*	1–80	76.6	[62]
MPA (total) MPA (libre)	Plasma	Total: PP (MeCN) Libre: Ultrafiltración	HPLC-UV	40/70 2/4	70–50,000 4–1,500	93–110 91–99	[168]

Tabla 2. Continuación

Analito	Matriz	Tratamiento de muestra	Técnica de análisis	LOD/LOQ (ng/mL)	Linealidad (ng/mL)	Recuperación (%)	Ref.
CsA Eve Sir FK506	WB	1) Centrifugación 2) MEPS <i>on-line</i> (C ₈)	LC-MS/MS	0.9/3* 0.15/0.5* 0.15/0.5* 0.15/0.5*	3-1,500 0.5-50 0.5-50 0.5-50	-	[70]
MPA (libre) MPAG(libre)	Plamas	1) Ultracentrifugación 2) SPE (C ₁₈) 3) Cambio de medio	HPLC-MS/MS HPLC-UV	-/1 -/2,500	1-200 1,000-50,000	81.5-85.2 76.6-76.8	[216]
FK506 Sir CsA	DBS (8 mm)	PP MeCN/ZnSO ₄	LC-MS/MS	-	1.2-40 1.2-40 30-1,000	-	[140]

* LLOQ.

CsA: ciclosporina A; DAD: detector de hilera de diodos; DBS: manchas de sangre seca; ECD: detector electroquímico; Eve: everolimus; FK506: tacrolimus; FLD: detector de fluorescencia; GC: cromatografía de gases; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; ISDs: inmunosupresores; LC: cromatografía líquida; LLE: extracción líquido-líquido; LLOQ: límite inferior de cuantificación; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; LR: rango lineal; MeCN: acetonitrilo; MeOH: metanol; MEPS: microextracción por sorbente empaquetado; MPA: ácido micofenólico; MPAG: glucuronido del ácido micofenólico; MS: espectrometría de masas; PP: precipitación de proteínas; Sir: sirolimus; SPE: extracción en fase sólida; TFC: cromatografía de flujo turbulento; UPLC: cromatografía líquida de ultra resolución; UV: detector de ultravioleta; VAMS: micromuestreo volumétrico de absorción; WB: sangre entera con EDTA

3.3. Métodos no cromatográficos

3.3.1. Inmunoensayos

El desarrollo de métodos de cribado basados en anticuerpos es una de las piedras angulares de los laboratorios clínicos y las compañías de diagnóstico. A diferencia de las técnicas cromatográficas, los inmunoensayos (IAs, del inglés *immunoassays*) pueden integrarse mejor en el núcleo de un laboratorio especializado o incluso formar parte de un dispositivo de diagnóstico inmediato,²¹⁷ gracias a su capacidad de automatización y trazabilidad.

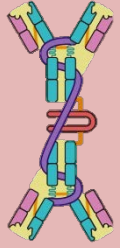
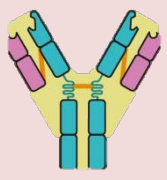
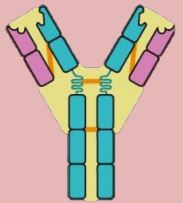
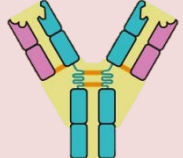
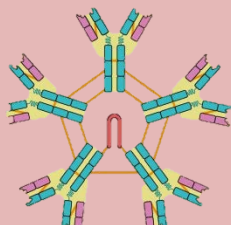
3.3.1.1. Anticuerpos

Los anticuerpos (Ab, del inglés *antibodies*) o inmunoglobulinas (Igs) son glicoproteínas globulares producidas por los linfocitos B durante la respuesta inmunitaria ante la presencia de un cuerpo extraño o antígeno (Ag).

Las Igs están formadas por una o más unidades estructurales básicas, constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H, del inglés *heavy*) y dos cadenas ligeras (L, del inglés *light*) (**Figura 12**). Estas cadenas idénticamente iguales entre sí se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro. En el extremo C-terminal de ambas cadenas aparece una región constante (C_L y C_H), cuya estructura depende del tipo de Ig, y en el extremo N-terminal una región variable (V_L y V_H).²¹⁸ La región variable, o dominio de unión, es la responsable de la interacción con el Ag. La cavidad tridimensional formada entre la V_L y V_H se denomina parátopo y es el sitio de reconocimiento específico del Ab que interacciona con una región única del Ag (epítopo) que se une al Ab.

Las Igs pueden hidrolizarse con la proteasa papaína, obteniéndose dos fragmentos diferentes: *el fragmento Fab*, que contiene al parátopo, y *el fragmento cristalizable Fc*, formado por la parte C-terminal de las cadenas pesadas, a través de las cuales las Igs son reconocidas por los diferentes receptores biológicos. Entre estas dos regiones se encuentra una *zona bisagra*, que proporciona flexibilidad a la proteína, permitiendo que se pueda adaptar y unir al Ag con mayor eficacia.

Tabla 3. Clasificación, características y estructura de las inmunoglobulinas.^{134,219,220}

Clase de Ig	Características	Estructura
IgA	<p>Peso molecular: >150 kDa</p> <p>Estructura: Monómero, dímero o trímero</p> <p>Porcentaje del total de Ig: 15%</p> <p>Glucosilaciones: 10% (en peso)</p> <p>Función: Protección en las membranas mucosas</p>	
IgD	<p>Peso molecular: ~ 180 kDa</p> <p>Estructura: Monómero</p> <p>Porcentaje del total de Ig: 0.2%</p> <p>Glucosilaciones: 13% (en peso)</p> <p>Función: Desconocida. Se encuentra en la superficie de los linfocitos B</p>	
IgE	<p>Peso molecular: ~ 190 kDa</p> <p>Estructura: Monómero</p> <p>Porcentaje del total de Ig: 0.002%</p> <p>Glucosilaciones: 12% (en peso)</p> <p>Función: Protección frente a parásitos y media en las reacciones alérgicas</p>	
IgG	<p>Peso molecular: ~ 150 kDa</p> <p>Estructura: Monómero</p> <p>Porcentaje del total de Ig: 75%</p> <p>Glucosilaciones: 3% (en peso)</p> <p>Función: Respuesta secundaria</p>	
IgM	<p>Peso molecular: ~ 900 kDa</p> <p>Estructura: Pentámero</p> <p>Porcentaje del total de Ig: 10%</p> <p>Glucosilaciones: 12% (en peso)</p> <p>Función: Respuesta primaria</p>	

Los Abs son proteínas plasmáticas pesadas, con masas moleculares comprendidas entre 150–900 kDa, un contenido en carbohidratos del 2 al 15% y un punto isoeléctrico (pI) comprendido entre 4.4 y 9.5. Hay 5 grupos o isotipos principales de Igs humanas: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Estas difieren en sus propiedades

fisicoquímicas (tales como carga, tamaño y solubilidad) y serológicas (reacciones *in vitro* con antígenos). Las principales características de estas Igs se encuentran recogidas en la **Tabla 3**.

La asociación del Ab con el Ag se produce mediante enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals y/o fuerzas electrostáticas. Todas ellas son interacciones débiles a nivel individual comparadas con un enlace covalente. En consecuencia, la fortaleza de la unión Ag-Ab requiere un elevado grado de complementariedad entre el antígeno y el anticuerpo, lo que necesariamente implica una especificidad exquisita entre ambas entidades.²²¹

La interacción que se establece entre el antígeno y el anticuerpo obedece a la ley de acción de masas y puede verse afectada por diferentes parámetros como son la temperatura, pH, fuerza iónica del medio, presencia de tensoactivos, etc. La modulación óptima de estos factores puede contribuir en la mejora de la especificidad, del grado de asociación Ag-Ab e, incluso, la disminución de las interacciones inespecíficas.^{222,223}

La obtención de Abs de origen natural se consigue mediante la inmunización de un animal con un determinado antígeno. Una problemática que aparece cuando se quieren conseguir anticuerpos frente a moléculas de bajo peso molecular ($MW < 1$ kDa), también denominados haptenos, es que éstas no son capaces de generar la respuesta inmune. Para conseguir que un hapteno genere la respuesta inmunitaria es necesario unirlo a una macromolécula ajena al organismo que se va a inmunizar, generándose un conjugado *hapteno-portador* que actúa como inmunógeno. Por lo general, se emplean proteínas inertes como la albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine serum albumin*), la ovoalbúmina (OVA) o la hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH, del inglés *keyhole limpets hemocyanin*).

Una vez suministrada la dosis correcta del inmunógeno, la inmunización puede conseguirse a partir de la respuesta celular del sistema inmunitario (células T), o a partir de su respuesta humoral (células B). En el último caso, la interacción de las células B con el antígeno es la responsable de su posterior diferenciación en células

plasmáticas que secretan el Ab para neutralizar al antígeno inoculado y facilitar su eliminación del cuerpo.

Dependiendo de su tamaño, un antígeno puede presentar diferentes regiones con actividad inmunitaria o *epítomos*, que pueden ser reconocidos por distintos Abs con diferentes grados de afinidad. Debido al dinamismo del sistema inmunitario, la composición de esta mezcla heterogénea de Abs (anticuerpos policlonales), capaces de reaccionar con el antígeno, experimenta cambios continuos. Esto, sumado a las respuestas diferenciadas de cada animal, hace que la mezcla de Abs sea poco eficaz para varios usos *in vitro*.²²¹

Dado que no es factible la purificación directa de un anticuerpo monoespecífico a partir de anticuerpos policlonales, en 1975 George Köhler y Cesar Milstein diseñaron un método para obtener anticuerpos específicos para un solo epítomo.²²⁴ La técnica de hibridación de células somáticas, que es como se conoce hoy en día, permite obtener Abs de una única especificidad, denominados anticuerpos monoclonales (mAbs). Tras inmunizar a un animal con el antígeno de interés se fusionan sus células B, productoras de Ab, con una línea celular tumoral (mieloma), que aporta inmortalidad, dando lugar a líneas celulares inmortales (hibridomas). Mediante procesos de cribado y selección se pueden identificar clones con las propiedades deseadas. Se trata pues de una producción ilimitada y reproducible.

Una alternativa que está teniendo cada vez más importancia es el uso de Abs recombinantes. Los anticuerpos recombinantes son proteínas de bajo peso molecular que pueden seleccionarse a partir de librerías específicas, evitando la inmunización de animales, y pueden modificarse genéticamente para mejorar su unión o para facilitar el marcaje con grupos funcionales destinadas a la detección, conjugación o purificación. Debido a su menor tamaño, pueden contribuir a reducir las uniones no específicas e impedimentos estéricos. Los más empleados son los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) y los fragmentos Fab (**Figura 12**). Al poder seleccionar los Ab recombinantes se consigue una gran versatilidad, obteniendo Abs frente a ciertas moléculas que no se conseguirían de forma natural.

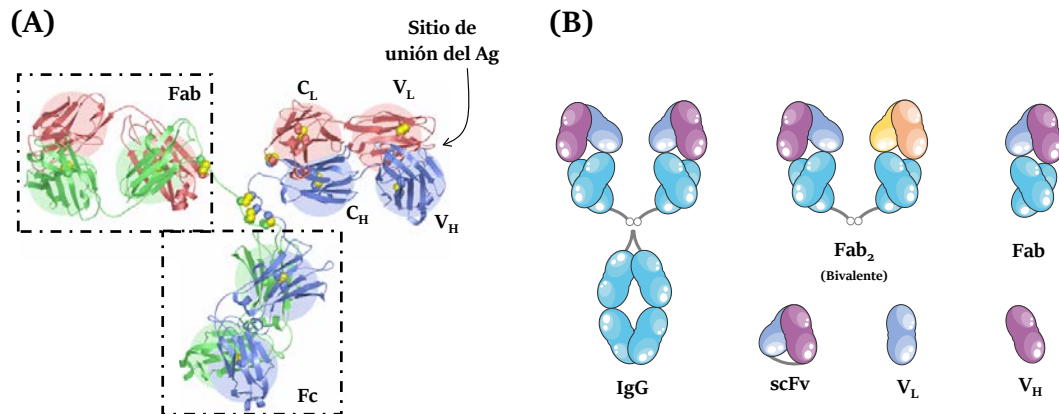


Figura 12. (A) Estructura básica de un anticuerpo, formado por dos cadenas pesadas (azul y verde) y dos cadenas ligeras (rojas). Adaptado de la referencia 225; (B) Representación esquemática de varios formatos de anticuerpos recombinantes.

3.3.1.2. Clasificación

Los inmunoensayos pueden clasificarse atendiendo a distintos criterios, por ejemplo, según la forma de detección (directos o indirectos), del formato en el que se basan (competitivos o no competitivos), etc.

- *Directos o indirectos.* Cuando no se requieren especies auxiliares para evaluar el reconocimiento se habla de inmunosensores directos. Mientras que, cuando se emplea una segunda especie marcada que proporciona una señal relacionada con la concentración de analito, se trata de un inmunosensor indirecto. En este caso, se clasificarían según el tipo de marcador, pudiéndose emplear enzimas, marcadores fluorescentes, radiactivos o moléculas quimioluminiscentes.

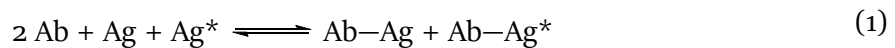
- *Competitivos o no competitivos.* En los ensayos competitivos (de inhibición o reactivo limitado) el analito compite con un homólogo marcado (generalmente inmovilizado) por los sitios de unión del Ab (reactivo limitante). En cambio, los no competitivos (o de reactivo en exceso) se basan en la medida de los sitios ocupados de los Ab (reactivo en exceso).

- *Homogéneos o heterogéneos.* Dependiendo de si la interacción se lleva a cabo en el seno de la disolución, sin que exista una separación física entre el analito y el resto de la matriz (homogéneo), o si se produce en la interfase entre la disolución y un soporte físico, produciéndose la separación física del analito del resto de los

componentes de la matriz (heterogéneo). En los formatos heterogéneos se puede inmovilizar tanto el Ab como el Ag. En la inmovilización de los biorreactivos se pueden emplear diferentes presentaciones tales como membranas, (nano)partículas, placas, etc., así como diferentes tipos de soportes plásticos, de vidrio o silicio, entre otros.

3.4. Características analíticas

Los inmunosensores y bioensayos desarrollados en la presente Tesis Doctoral se basan en un formato de ensayo de tipo competitivo que, en el caso de utilizar un Ab como elemento de reconocimiento, puede describirse empleando la Ecuación 1:²²⁶



Donde el Ag compete con un homólogo (Ag*) por los sitios de unión específicos del Ab, que se encuentra en cantidad limitante. La formación del complejo Ab-Ag* va a depender de la cantidad de Ag presente en la muestra, permitiendo su cuantificación. La reacción de afinidad entre el antígeno y el anticuerpo está regida por la ley de acción de masas, por tanto el curso de la reacción va a depender tanto de parámetros cinéticos (ej. velocidad de difusión de los inmunoreactivos) como termodinámicos (ej. constante de afinidad).

En este tipo de ensayo no existe una relación lineal entre la señal medida y la concentración de analito. Las curvas de calibrado obtenidas, representando la señal en función del logaritmo de la concentración de analito, tienen forma sigmoidea y se pueden ajustar a una ecuación logística de cuatro parámetros (Ecuación 2):

$$\text{Señal} = \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + \left(\frac{[\text{analito}]}{IC_{50}}\right)^b} + A_{min} \quad (2)$$

donde, A_{max} es la asíntota máxima correspondiente a la señal en ausencia de analito, A_{min} es la asíntota mínima que corresponde a la señal en exceso de analito, b es la pendiente de la curva en el punto de inflexión e IC_{50} corresponde al valor de la concentración de analito en dicho punto. Ambos valores, IC_{50} y b , son indicativos de la sensibilidad y del intervalo dinámico o de trabajo del método desarrollado.

Otros parámetros analíticos de interés que se definen a partir de la curva de calibración son, el límite de detección (LOD, del inglés *limit of detection*), que indica la concentración del analito que origina una disminución de la señal del 10% con respecto al blanco y el intervalo dinámico o de trabajo (DR, del inglés *dynamic range*), que se define como el intervalo de concentraciones de analito que produce una señal comprendida entre el 80% y el 20% del intervalo definido por las asíntotas máxima y mínima (A_{\max} y A_{\min}). Estos parámetros, junto con el valor IC_{50} , se utilizan para estimar la sensibilidad del ensayo (**Figura 13**).

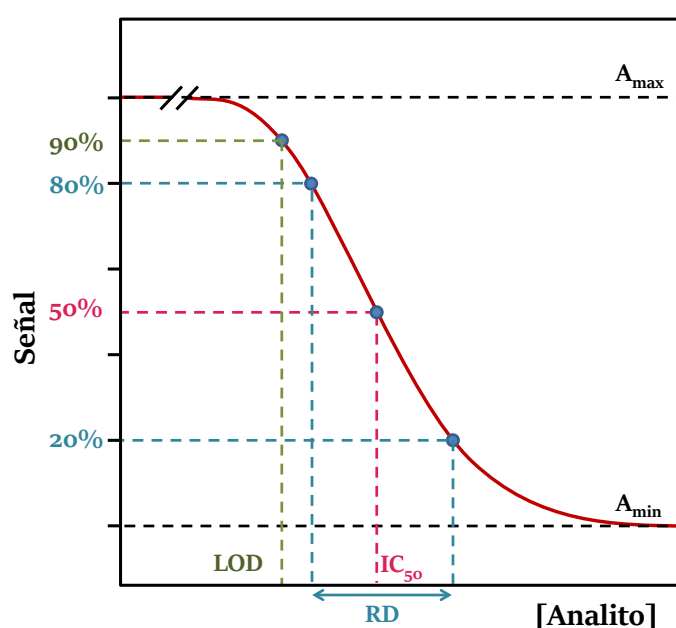


Figura 13. Curva de calibrado típica para un inmunoensayo de tipo competitivo. La concentración de analito se expresa en unidades logarítmicas.

Normalmente se utilizan señales analíticas normalizadas para la calibración en este tipo de ensayos (3):

$$\text{Señal normalizada} = \left(\frac{B - B_{\infty}}{B_0 - B_{\infty}} \right) \quad (3)$$

donde B es la señal obtenida en una concentración dada; B_0 es la señal obtenida en ausencia de analito y B_{∞} la señal correspondiente a una muestra con alto exceso de analito.

Pese a que los inmunoensayos son ampliamente utilizados en los laboratorios de análisis pueden estar sujetos a una serie de interferencias que arrojan como resultado

falsos positivos o negativos. Estas interferencias pueden deberse a moléculas con una similitud estructural al analito de interés que son reconocidas por el anticuerpo produciendo respuestas mayores (interferencia positiva) o menores (interferencia negativa) a la obtenida en presencia del analito. En el caso de los ISDs, los interferentes más habituales son las debidas a los metabolitos del analito o a moléculas de la misma familia. Esta circunstancia que determina la selectividad del ensayo se define a partir de la reactividad cruzada (CR, del inglés *cross-reactivity*) o relación porcentual entre los valores de IC₅₀ para el analito de interés y para el interferente, calculado según la Ecuación 4:

$$CR(\%) = \frac{IC_{50}^{\text{Analito}}}{IC_{50}^{\text{Interferente}}} \times 100 \quad (4)$$

En general, se puede decir que un compuesto interfiere sensiblemente cuando la CR es igual o superior al 10%, su interferencia es poco importante si la CR se encuentra entre el 1% y el 10% y despreciable si es inferior al 1%.

3.6. Formatos de inmunoensayos aplicados al análisis de ISDs.

A continuación se describen brevemente algunos de los formatos de inmunoensayos empleados en dispositivos comerciales con transducción óptica para la detección de ISDs (**Figura 14**).

A) *Inmunoensayo empleando partículas magnéticas conjugadas con el antígeno*

En este tipo de inmunoensayo (ACMIA, del inglés *antibody conjugated magnetic immunoassay*) la muestra se pone en contacto con un anticuerpo selectivo marcado con la enzima β -galactosidasa y el antígeno inmovilizado sobre partículas magnéticas (**Figura 14A**). Las partículas se atrapan con un imán, se elimina el exceso de anticuerpo y se lleva a cabo la reacción enzimática. La señal obtenida será directamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra.²²⁷

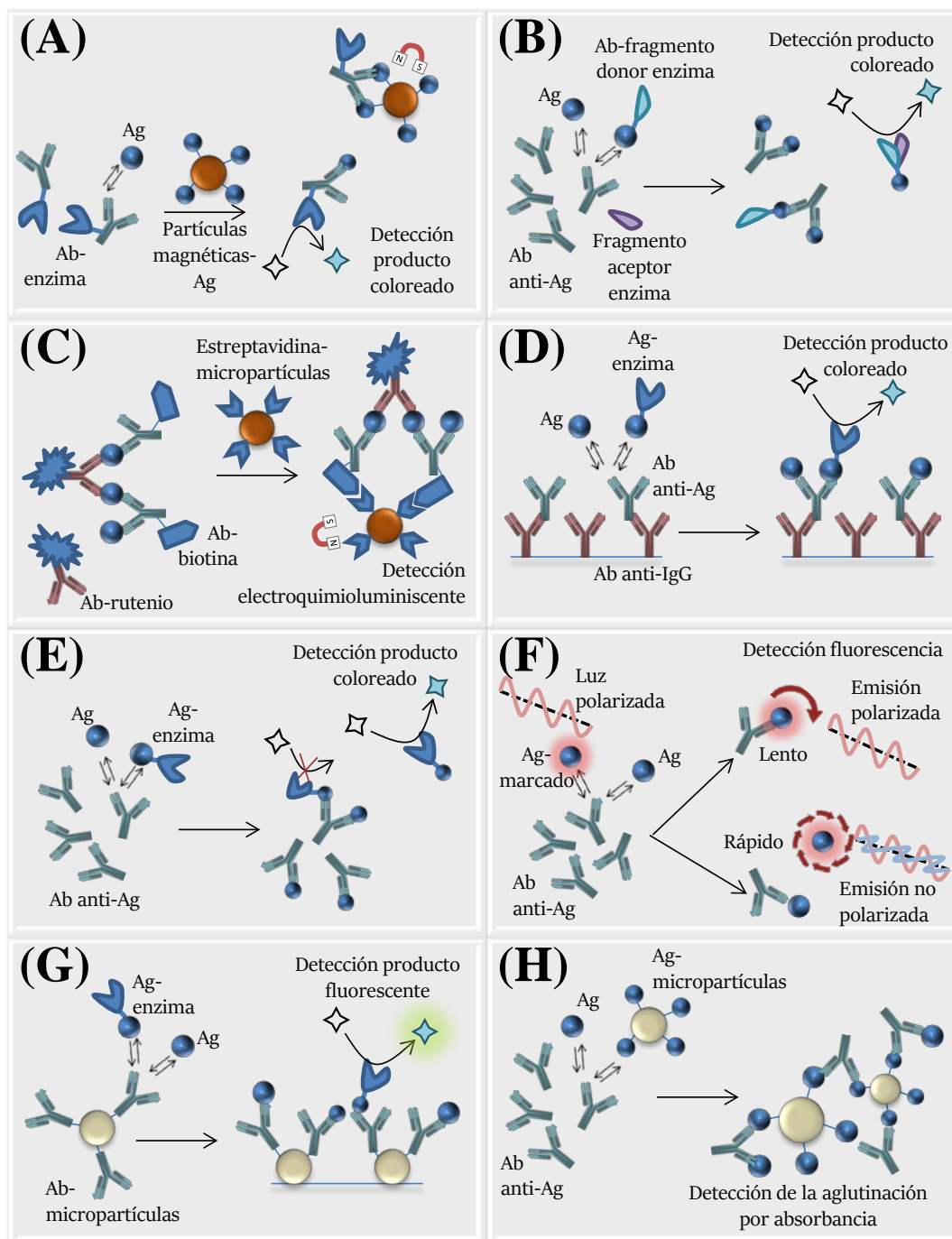


Figura 14. Esquemas de los inmunoensayos comerciales disponibles para la detección de ISDs, empleando como elemento de reconocimiento anticuerpos específicos y detección luminiscente o colorimétrica. **(A)** Inmunoensayo basado en el empleo de partículas magnéticas conjugadas con el antígeno y el anticuerpo selectivo ligado a una enzima; **(B)** Inmunoensayo basado en el empleo de un donador enzimático clonado (CEDIA); **(C)** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ECLIA); **(D)** Inmunoensayo enzimático con Ab inmobilizado (ELISA); **(E)** Inmunoensayo multiplicado enzimáticamente (EMIT); **(F)** Inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA); **(G)** Inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA); **(H)** Sistema de microesferas funcionalizadas con el antígeno que aglutinan en ausencia de analito (QMS).

B) Immunoensayo de donador enzimático clonado

El immunoensayo basado en el empleo de un donador enzimático clonado (CEDIA, del inglés *cloned enzyme donor immunoassay*) emplea dos fragmentos mutados e inactivos de la enzima β -galactosidasa (β -gal) que, en las condiciones adecuadas, se ensamblan espontáneamente (complementación α), restableciéndose la funcionalidad enzimática (**Figura 14B**). En el ensayo CEDIA, el analito inhibe la unión de un análogo conjugado al fragmento α de la β -gal al anticuerpo. Al añadir el segundo fragmento (fragmento ω), solo se obtendrá la enzima activa si el antígeno marcado se encuentra en disolución. El producto coloreado de la reacción enzimática puede medirse espectrofotométricamente. La señal obtenida será directamente proporcional a la cantidad de enzima re-asociada y, en consecuencia, a la concentración de analito presente en la muestra.²²⁸

C) Immunoensayo electroquimioluminiscente

El immunoensayo electroquimioluminiscente (ECLIA, del inglés *electrochemiluminescence immunoassay*) se basa en un formato de ensayo tipo sándwich, que emplea dos anticuerpos selectivos a diferentes epítomos del analito, uno de ellos biotinilado y el otro marcado con un complejo de rutenio (**Figura 14C**). El complejo (Ab-Ag-Ab) formado se atrapa empleando micropartículas funcionalizadas con estreptavidina que se ponen en contacto con el electrodo. Al aplicar el voltaje adecuado se induce la emisión quimioluminiscente que se registra en el equipo de medida. La señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.²²⁹

D) Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) puede realizarse empleando distintos formatos, sándwich o competitivo. En el primer caso, uno de los Ab se inmoviliza sobre la superficie de un pocillo, mientras que el segundo marcado con la enzima se añade a la disolución (**Figura 14D**). En el formato competitivo, el Ab selectivo se ancla sobre la superficie y se emplea un analito marcado con la enzima, o viceversa. La enzima utilizada en estos

ensayos suele ser la HRP y, dependiendo del sustrato utilizado, la detección puede ser colorimétrica o fluorescente, siendo la respuesta directa (sándwich) o inversamente (competitivo) proporcional a la concentración de analito.¹³⁴

E) Inmunoensayo multiplicado enzimáticamente

El inmunoensayo multiplicado enzimáticamente (EMIT, del inglés *enzyme-multiplied-immunoassay technique*) es un ensayo competitivo homogéneo en el que el analito y el Ag marcado con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa compiten por los sitios de unión del Ab selectivo (**Figura 14E**). Cuando el Ag marcado está unido al anticuerpo, el sitio activo de la enzima se bloquea de forma que la enzima no cataliza la transformación del sustrato que genera un producto que se determina espectrofotométricamente a 340 nm. La señal obtenida es directamente proporcional a la concentración del analito.²³⁰

F) Inmunoensayo de polarización de fluorescencia

El inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA, del inglés *fluorescence polarization immunoassay*) es un ensayo homogéneo de tipo competitivo para moléculas pequeñas (**Figura 14F**). En ausencia de analito, el análogo fluorescente se une al Ab de forma que el complejo Ag-Ab tendrá una libertad de giro restringida, y al excitarlo con una luz polarizada la emisión que se obtiene también lo estará, permitiendo su detección. Al aumentar la concentración del analito, también lo hace la fracción del análogo fluorescente libre en disolución, que rota rápidamente emitiendo luz no polarizada al excitarlo con luz polarizada. La señal generada es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.¹⁶⁷

G) Inmunoensayo enzimático sobre micropartículas

El inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA, del inglés *microparticle enzyme immunoassay*) es un ensayo heterogéneo. Se utilizan micropartículas funcionalizadas con el Ab selectivo al analito que se incuban con la muestra y con el Ag marcado con la proteína fosfatasa alcalina (**Figura 14G**). A continuación, la mezcla se filtra a través de una fibra de vidrio, donde las partículas quedan capturadas irreversiblemente. Se añade el sustrato fosfato de 4-

metilumbeliferilo y tras la reacción enzimática se mide la señal de fluorescencia del producto ($\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 448 \text{ nm}$). Esta señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.²³¹ Alternativamente, este ensayo puede realizarse inmovilizando en las partículas el antígeno y empleando un anticuerpo marcado con la enzima, o empleando un formato tipo sándwich.

H) Sistema de microesferas para análisis cuantitativo

Sistema de microesferas funcionalizadas con el antígeno que aglutinan en ausencia de analito (QMS, del inglés *quantitative microsphere system*) es un inmunoensayo heterogéneo turbidimétrico basado en la competición entre el analito presente en la muestra y el analito inmovilizado en la superficie de una partícula, por los sitios de unión del anticuerpo (**Figura 14H**). En ausencia de analito las partículas se aglutinan rápidamente debido a las interacciones producidas con los anticuerpos, mientras que en presencia de analito la aglutinación se inhibe. El cambio de la absorbancia se mide espectrofotométricamente (700 nm) y la señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.²³²

Los inmunoensayos descritos anteriormente se emplean de forma habitual en ensayos comerciales y no comerciales para la detección de ISDs.

En términos generales, una de las ventajas de los IAs es que el tratamiento de la muestra previo al ensayo es de menor complejidad que el necesario para el análisis de los ISDs mediante métodos cromatográficos.^{188,233} Por lo general, sólo se requiere una etapa previa de precipitación de proteínas.

Existen numerosas publicaciones en las que se realiza una comparativa entre las figuras de mérito de los IAs y diferentes métodos cromatográficos,²³⁴⁻²³⁷ siendo la mayor desventaja de los IAs su elevada reactividad cruzada frente a metabolitos activos o inactivos de los ISDs presentes en la muestra. A pesar de ello, los resultados obtenidos son fiables en la mayoría de los casos y pueden utilizarse para los estudios de TDM en terapias inmunosupresoras.²³⁸

El MPA se ha detectado y cuantificado usando diferentes esquemas de detección²³⁹ tales como EMIT,²³⁴ CEDIA,²⁴⁰ turbidimetrías o el inmunoensayo de

inhibición turbidimétrica potenciado con partículas (PETINIA, del inglés *particle enhanced turbidimetric inhibition immunoassay*).²⁴¹ En todos los casos se han observado reactividades cruzadas con sus metabolitos glucurónidos que pueden conducir a sobreestimaciones de entre el 8.3 y el 52.3%.⁶

En el caso de la CsA, analizada mediante ACMIA, EMIT, CEDIA y FPIA,²⁴²⁻²⁴⁶ las sobrestimaciones con respecto a la cuantificación mediante métodos cromatográficos se calculan alrededor del 12 – 40%.

El análisis de FK506 en sangre se ha llevado a cabo empleando distintas técnicas como EMIT, ACMIA, MEIA, CEDIA o ECLIA, observándose desviaciones de hasta el 33% debidas a la reactividad cruzada con sus metabolitos.^{93,247} Por ejemplo, Kaneko y col.²³⁵ realizaron una comparativa entre los ensayos CLIA, ACMIA y EMIT demostrándose que todos ellos proporcionaban resultados estadísticamente comparables a los obtenidos con LC-MS/MS, siendo el ACMIA y CLIA los métodos más fiables. Por otro lado, se ha observado que la determinación de FK506 mediante MEIA puede presentar una alta tasa de falsos positivos debido a la interferencia producida por los hematocritos.^{248,249}

Dada la carencia de materiales de referencia certificados, los IAs deben validarse empleando técnicas de referencia, como es el caso del LC-MS/MS. Sin embargo, estas técnicas no siempre ofrecen mejores prestaciones analíticas que los IAs en ausencia de estandarización. Un estudio realizado por Levine y col.²⁵⁰ evaluaba la precisión de diferentes métodos basados en LC-MS/MS en comparación con inmunoensayos desarrollados para la cuantificación de FK506. La precisión interlaboratorio para los métodos de LC-MS/MS (%CV: 11.4 – 18.7%) fue inferior a la obtenida en los laboratorios que usaban el mismo CMIA comercial para FK506 (%CV: 3.9 – 9.5%).

Por otro lado, Shipkova y col.²⁵¹ compararon los resultados del ensayo CEDIA para el MPA con los resultados obtenidos mediante HPLC-UV. El estudio confirmó que la sobreestimación en las determinaciones del MPA con el IA era del 15% para los pacientes trasplantados de corazón y del 52.3% para aquellos trasplantados de hígado debido a la reactividad cruzada con el AcMPAG.

Como ya se discutió anteriormente, la fracción libre de los ISDs es la responsable tanto del efecto terapéutico como de los efectos secundarios de estos medicamentos. Sin embargo, los niveles de concentración de la fracción libre en sangre del FK506 y CsA son del orden de fg/mL, precisando de técnicas muy sensibles que incrementan los costes del análisis, por lo que generalmente solo se monitoriza su concentración total. No sucede lo mismo con el MPA que sí se encuentra como molécula libre a niveles cuantificables en plasma. Sin embargo, se han descrito escasos IAs para su determinación siendo un ensayo EMIT modificado el más destacable, aunque los autores mostraron resultados no validados que estaban afectados por la presencia de una interferencia “no identificada”.²⁵²

En la bibliografía se describen otros formatos de ensayo que difieren de los comerciales empleados habitualmente. Por ejemplo, Menotta y col.²⁵³ desarrollaron un método directo para la detección de FK506 en sangre entera mediante microscopía de fuerza atómica (AFM, del inglés *atomic force microscopy*). Los Abs anti-FK506 se inmovilizan en una superficie de mica, incubándose con la muestra de sangre entera conteniendo FK506, previamente tratada con PP y SPE. Tras una etapa de lavado, se añade la proteína de unión al FK506 (FKBP12), previamente inmunocomplejada con un Ab anti-FKBP12. Seguidamente, la superficie se seca con una corriente de nitrógeno y se realiza la medida. Según los autores, el ensayo arrojó resultados similares a los de un ELISA comercial en el intervalo de 0 – 30 ng/mL.

Otro método directo aplicado al análisis de CsA se basa en el empleo de ondas acústicas superficiales con fugas (LSAW, del inglés *leaky surface acoustic wave*).²⁵⁴ El anti-CsA se inmoviliza en la superficie de oro del cristal piezoeléctrico y se incuba con la muestra. En presencia de CsA se produce la unión Ab-Ag aumentando la masa, lo que provoca el desplazamiento de fase del LSAW. Los autores no observaron reactividad cruzada con el FK506, se evaluó la regeneración de la superficie y los resultados se validaron con un ensayo EMIT, obteniéndose una buena correlación.

En una aproximación diferente, Salis y col.²⁵⁵ emplearon nanopartículas magnéticas dopadas con dos indicadores de la familia de los 4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos (BODIPYs) entre los que se producía un proceso de transferencia de

energía de resonancia de tipo FRET, observándose un desplazamiento virtual de Stokes de ~150 nm. El ensayo competitivo se lleva a cabo en placas de 96-pocillos, cuya superficie se funcionalizó con un derivado ácido del FK506 que competía con el FK506 libre por los sitios de unión del IgM anti-FK506. Las nanopartículas, recubiertas con un IgG anti-IgM, se adicionaron al pocillo y, tras la incubación y retirada del exceso de reactivos, se registró la señal analítica, que resultó ser inversamente proporcional a la concentración de ISD en la muestra. Los autores demostraron que el ensayo realizado en modo FRET (empleando los dos indicadores) mejoraba significativamente las figuras de mérito con respecto al mismo procedimiento empleando detección convencional (monitorizando sólo el indicador de excitación en el rojo).

Murakami y col.²⁵⁶ han descrito la cuantificación de FK506 mediante un inmunoensayo de tipo competitivo con detección enzimática, llevado a cabo con un dispositivo microfluídico de poli(dimetilsiloxano). Para ello, colocaron en el canal de flujo partículas de poliestireno recubiertas con anticuerpo anti-FK506 que se incubaron con FK506 y un trazador de FK506 marcado con la enzima HRP. La detección se lleva a cabo midiendo la formación de un producto fluorescente de la enzima. El empleo del dispositivo microfluído proporcionó una mayor sensibilidad y un menor tiempo de ensayo que los conseguidos al emplear las partículas en una placa multipocillo.

Uno de los retos para la realización de los estudios TDM es desarrollar sensores de diagnóstico inmediato (POC, del inglés *Point-of-care*). Los POCs son útiles en situaciones clínicas, ya que permiten al facultativo conocer la concentración del fármaco en un determinado momento y poder así ajustar de forma inmediata la dosis basándose en datos objetivos. Estas pruebas *in situ* ahorran tiempo, pudiendo identificar de forma temprana problemas debidos a la variabilidad entre pacientes y así reducir los riesgos clínicos. Si bien, por el momento, solo existen un par de ejemplos de dispositivos POC comerciales para la detección de inmunosupresores biológicos (Infliximab y Adalimumab) basados en inmunoensayos tipo sándwich de flujo lateral,²⁵⁷⁻²⁵⁹ se están investigando nuevos diseños para desarrollar estos dispositivos que permitan la monitorización de forma semi-continua de otros fármacos. Podría

decirse que el reto más importante en el campo de los dispositivos POC es el desarrollo de sensores miniaturizados implantables y portátiles.¹⁰⁸ Una solución a este problema es el catéter de microdiálisis propuesto en el marco del proyecto NANODEM (*"NANOphotonic DEvice for Multiple therapeutic drug monitoring"*), financiado por la Unión Europea, en el que se enmarca parte del trabajo de investigación desarrollado en la presente Tesis Doctoral. Este enfoque pretende una monitorización semicontinua de hasta 48 h, pudiendo monitorizar el AUC de los fármacos libres,²⁶⁰ que son los responsables del efecto farmacológico y los efectos secundarios. Las medidas de los fármacos se basan en inmunoensayos competitivos que se llevan a cabo en los canales de un chip microfluídico empleando TIRF para la detección. Los ensayos preliminares del dispositivo de medida mostraron un LOD de 0.11 ng/mL para el FK506;²⁶¹ también realizaron ensayos para determinar la CsA libre mediante microdiálisis, obteniendo una buena correlación con LC-MS/MS y siendo posible regenerar la superficie de medida empleando SDS.²⁶⁰

Otro dispositivo con potencial para desarrollar POC es el descrito por Liu y col.,²⁶² empleando rejillas de alto contraste. Sobre ellas se inmovilizan Abs anti-CsA midiéndose los cambios producidos en el espectro de reflexión tras su incubación con el fármaco, obteniendo un LOD de 0.54 ng/mL. No obstante, este sistema emplea un láser regulable con una elevada precisión que incrementa los costes para su aplicación al desarrollo de dispositivos POC.

A modo de resumen, en las **Tablas 4** y **5** se incluyen las principales características analíticas de algunos inmunoensayos comerciales y no comerciales descritos en bibliografía para la determinación de ISDs.

Tabla 4. Resumen de las características analíticas de métodos comerciales desarrollados para la determinación de ISDs en matrices biológicas.

ISD	Principio de ensayo	Casa comercial	LOD/LOQ (ng/mL)	Linealidad (ng/mL)	Matriz	Tamaño de muestra (μL)
FK506	ACMIA	Siemens (Dimension)	0.7/1	1–30	WB	15
	CEDIA	Thermo Scientific	-/2	2–30	WB	200
	CMIA	Abbott (ARCHITECT)	0.3/2	2–30	WB	200
	ECLIA	Roche (Elecsys®)	0.5/1	0.5–40	WB	300
	ELISA	ABBEXA/AVIVA/SAB	<0.069/-	0.156–10	S/P/O	50
	ELISA	Creative Diagnostics	-/-	1–100	-	25
	ELISA	MyBioSource	0.1/-	2.5–40	S/P/O	10
	EMIT	Siemens (EMIT 2000)	-/2	2–30	WB	200
	QMS	Thermo Scientific	-/0.9	1–30	WB	200
MPA	CEDIA	Thermo Scientific	200/300	300–10,000	P	-
	EMIT	Roche (Total MPA)	-/310	400–15,000	S/P	-
	EMIT	Siemens (EMIT 2000)	-/-	100–15,000	P	-
	PETINIA	Siemens (MPAT Flex®)	120/-	200–30,000	P	-
CsA	ACMIA	Siemens (Dimension)	-/-	25–500 350–2,000	WB	200
	ADVIA	Siemens (ADVIA Centaur®)	-/30	30–1,500	WB	100
	CEDIA	Thermo Scientific	-/25	25–450 450–2,000	WB	100
	CMIA	Abbott (ARCHITECT)	25/30	30–200 200–1,500	WB	200
	ECLIA	Roche (Elecsys®)	30/50	30–2,000	WB	300
	EMIT	Siemens (EMIT 2000)	-/40	C ₀ : 40–500 C ₂ : 500–2,000	WB	200
	RIA	Beckman Coulter	1.61/-	1.61–2,500	WB	20
Sir	ACMIA	Siemens (Dimension)	1.7/-	2–30	WB	200
	CMIA	Abbott (ARCHITECT)	0.3/-	2–30	WB	150
	ECLIA	Roche (Elecsys®)	0.5/1.5	0.5–30	WB	300
	EMIT	Siemens (EMIT 2000)	-/3.5	3.5–30	WB	400

Tabla 4. Continuación.

ISD	Principio de ensayo	Casa comercial	LOD/LOQ (ng/mL)	Linealidad (ng/mL)	Matriz	Tamaño de muestra (µL)
Eve	ECLIA	Roche (Elecsys®)	0.5/1	0.5/30	WB	300
	LTIA	Sekisui medical (Nanopia TDM)	-/-	2–20	WB	300
	QMS	Thermo Scientific	-/1.3	1.5–20	WB	300

ACMIA: inmunoensayo magnético de anticuerpos conjugados; ADVIA: inmunoensayo quimioluminiscente directo usando éster de acridinio; CEDIA: inmunoensayo de donador enzimático clonado; CMIA: inmunoensayo quimioluminiscente con micropartículas; CsA: ciclosporina A; ECLIA: inmunoensayo electroquimioluminiscente; ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima; EMIT: inmunoensayo enzimático multiplicado; Eve: Everolimus; FK506: tacrolimus; ISD: inmunosupresor; LTIA: Inmunoensayo turbidimétrico de agregación de látex; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; MPA: ácido micofenólico; O: otros fluidos biológicos; P: plasma; PETINIA: inmunoensayo de inhibición turbidimétrico potenciado con partículas; QMS: sistema de microesferas para análisis cuantitativo; RIA: radioinmunoensayo; S: suero; Sir: sirolimus; WB: sangre entera.

Tabla 5. Resumen de las características analíticas de inmunoensayos descritos en la bibliografía para la determinación de ISDs

Análito	Técnica de análisis	Matriz	Tratamiento de muestra	LOD/LOQ (ng/mL)	Linealidad (ng/mL)	Comparación (Correlación, R)	Ref.
CsA	LSAW	WB	n.d.	0.89/2.96	1–1,000	EMIT (0.9994)	[254]
FK506	TRFIA	WB	Incubación 75°C, 15 min: Tris-HCl, urea, proteasa, T20, pH 8	0.57/-	1.1–28.6	CMIA (0.982)	[263]
MPA (libre)	EMIT	P	Ultrafiltración	1/5	10–1,250	-	[252]
FK506	FIA	Buffer	-	0.08/-	0.15–2	-	[255]
FK506	TIRF	Buffer	-	0.11/0.57	-	-	[261]
CsA	ELISA	WB	PP: MeOH	25/-	60–1,400	RIA (0.965) FPIA (0.983)	[264]
MPA (libre)	FPIA	P/S	Ultrafiltración	0.8/-	1.7–39	RRLC-DAD	[167]
Eve	LTIA	WB	PP: MeOH	-/1.5	1.5–20	FPIA (0.942) LC-MS/MS (0.946)	[265]

Tabla 5. Continuación

Analito	Técnica de análisis	Matriz	Tratamiento de muestra	LOD/LOQ (ng/mL)	Linealidad (ng/mL)	Comparación (Correlación, R)	Ref.
MPA	PETINIA	WB	Centrifugar (3,000 rpm; 10 min)	110/-	1,000–14,000	EMIT (0.994)	[266]
FK506	ECIS	S	-	0.17/-	1–30	-	[267]
Eve	QMS	WB	-	-/1.3	1.5–20	LC-MS (0.916)	[268]
FK506	ACMIA	WB	Kit comercial	-/3	3–31.4	LC-MS/MS (0.9)	[269]
FK506	ECLIA	WB	PP: MeOH + ZnSO ₄	0.3/-	0.5–40	LC-MS/MS CMIA	[238]

ACMIA: inmunoensayo magnético de anticuerpos conjugados; CMIA: inmunoensayo quimioluminiscente con micropartículas; Csa: ciclosporina A; DAD: detector de hilera de diodos; ECIS: inmunosensor electroquímico; ECLIA: inmunoensayo electroquimioluminiscente; ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima; EMIT: inmunoensayo enzimático multiplicado; Eve: everolimus; FIA: inmunoensayo de fluorescencia; FK506: tacrolimus; FPIA: inmunoensayo de polarización de fluorescencia; LC: cromatografía líquida; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; LR: rango lineal; LSAW: filtración de onda acústica de superficie; LTIA: Inmunoensayo turbidimétrico potenciado con látex; MeOH: metanol; MPA: ácido micofenólico; MS: espectrometría de masas; n.d.: no descrito; P: plasma; PP: precipitación de proteínas; QMS: sistema de microesferas para análisis cuantitativo; RIA: radioinmunoensayo; RRLC: Cromatografía líquida de rápida resolución; S: suero; T20: Tween 20; TIRF: fluorescencia de reflexión interna total; TRFIA: inmunoensayo de fluorescencia de tiempo resuelto; WB: sangre entera

3.5. Otros métodos

Como alternativa a los métodos cromatográficos e inmunológicos, en los últimos años se han descrito métodos sencillos y rápidos para la cuantificación e identificación química de compuestos farmacéuticos basados en la introducción directa de la muestra en el detector de masas. En general, estos métodos consisten en la ionización directa de la muestra de sangre seca,²⁷⁰ de forma que la extracción y la ionización se realiza directamente de forma automatizada a partir del sustrato de papel o después de un tratamiento de muestra previo. En este caso, el procedimiento consiste en una simple desproteización,²⁷¹ en combinación con SPE *on-line*,²⁷² acompañada de una desorción en el detector mediante una interfaz microfluídica abierta,¹⁶¹ u *off-line*, sobre una hoja metálica recubierta de un polímero sobre la cual se realiza la ionización.¹⁶⁰ De esta forma los análisis son mucho más rápidos y el consumo de disolventes es menor, aunque se necesita personal especializado, lo que puede traducirse en mayores costes.

Marzejon y col. han propuesto la detección y cuantificación de CsA en muestras de agua²⁷³ y de fluidos biológicos²⁷⁴ empleando un método espectroscópico basado en medidas de absorbancia. Los espectros obtenidos son analizados mediante un algoritmo que detecta la longitud de onda del máximo y establece una relación con los niveles de concentración del fármaco.

Como ya se ha comentado anteriormente, los anticuerpos son los elementos de reconocimiento de origen biológico más utilizados en el desarrollo de biosensores de afinidad. Sin embargo, el uso de Ab puede sustituirse, o combinarse,²⁵³ con otros biorreceptores como, por ejemplo, proteínas receptoras del analito que están involucradas en su mecanismo de acción. Mediante esta aproximación se ha llevado a cabo la determinación de FK506 en microarrays de FKBP1A depositados sobre un chip recubierto de dextrano y utilizando resonancia de plasmón superficial (SPRi, del inglés *surface plasmon resonance imaging*). Los autores evaluaron diferentes mutantes de la proteína receptora, FKBP12, determinando la constante de unión del complejo FK506-FKBP12A, así como la formación del complejo trímero formado por el FKBP12-FK506-calcineurina.^{275,276}

Los avances de la ingeniería genética han propiciado el desarrollo de proteínas receptoras quiméricas con multitud de posibilidades, incluso en el campo de los biosensores. Griss y col.²⁷⁷ han aplicado esta aproximación para diseñar un sensor bioluminiscente para la determinación de FK506, Sir o CsA. La aproximación consiste en un ensayo homogéneo que emplea un receptor (la inmunofilina FKBP12 o la ciclofilina A humana) del fármaco de interés fusionado a la luciferasa NanoLuc. A su vez, la proteína recombinante está marcada con una molécula sintética que contiene un fluoróforo y un ligando (análogo del ISDs) de la proteína receptora. En ausencia de analito se produce la unión intramolecular de los ligandos a las proteínas recombinantes, FKBP12-NanoLuc y ciclofilina A-NanoLuc, acercando el fluoróforo a la luciferasa y provocando una transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET, del inglés *bioluminescent resonance energy transfer*). En presencia del ISD específico, el ligando es desplazado y la eficiencia del BRET disminuye. La relación entre la radiación emitida por el fluoróforo y la luciferasa permite la cuantificación del analito con un IC_{50} de 17 nM, 5.9 μ M y 13.7 nM para el FK506, CsA y Sir, respectivamente. El bioensayo se aplicó tanto a muestras de suero como de sangre entera y los resultados se compararon con un ensayo FPIA, observándose una buena correlación. Considerando que esta aproximación emplea volúmenes pequeños de muestra y que la detección se realiza con una cámara digital, este ensayo podría integrarse fácilmente en un dispositivo POC.

Mansouri y col.²⁷⁸ han descrito la aplicación de aptámeros fluorescentes para la cuantificación de FK506. La selección del aptámero se realizó empleando la evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX, del inglés *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*). A continuación, el aptámero se marcó con el fluoróforo ATTO 647 N. Para la realización del ensayo se adiciona una mezcla de láminas de grafeno y del aptámero marcado a la muestra, de forma que en presencia del analito se obtiene una señal máxima, mientras que ausencia del mismo las moléculas de aptámero libres se adsorben sobre la superficie del grafeno desactivándose su emisión. Se obtuvo un LOQ de 2.5 nM.

La electroforesis capilar (CE, del inglés *capillary electrophoresis*) también se ha empleado como alternativa al análisis cromatográfico en la separación de ISDs combinada con detección MS^{279,280} y UV.²⁸¹⁻²⁸³

En la **Tabla 6** se recogen las características analíticas de algunos de estos métodos descritos en la bibliografía para la determinación de IDs.

Tabla 6. Resumen de las características analíticas de otros métodos descritos en la bibliografía para la determinación de IDs

Analito	Técnica de análisis	Matriz	Tratamiento de muestra	LOD/LOQ (ng/mL)	Linealidad (ng/mL)	Comparación/Validación	Ref.
CsA Sir Eve FK506	CBS-MS/MS	WB	PP ZnSO ₄ (0.1 M):MeCN:H ₂ O (60:30:10, v/v)	-/2.5 -/1 -/0.25 -/1	2.5–1,000 1–100 0.25–100 1–50	CMIA	[160]
FK506	PS-MS/MS	DBS	Extracción MeOH/CHCl ₃ /NaOAc (40/60/0.1, v/v)	0.2/1.5*	1.5–30	LC-MS/MS	[270]
CsA	LDTD-APCI-MS/MS	WB	PP MeOH/ZnSO ₄ (0.2 M) (80/20, v/v)	-/23.5*	23.5–965	HPLC-ESI-MS/MS	[271]
FK506 Sir Eve CsA	SPME-MOI-MS/MS	WB	PP MeCN/ZnSO ₄ (0.1 M)/H ₂ O (30/60/10, v/v)	-/1 -/0.25 -/0.3 -/0.6	1–50 1–50 1–50 10–500	-	[161]
CsA FK506 Sir Eve	CBS-MS/MS	WB	PP H ₂ O: MeCN (85:15) 0.1 M ZnSO ₄	3/10 0.3/1 1/2.5 0.3/1	10–1,000 1–100 2.5–100 1–100	Liquichek™	[284]

Tabla 6. Continuación

Analito	Técnica de análisis	Matriz	Tratamiento de muestra	LOD/LOQ (ng/mL)	Linealidad (ng/mL)	Comparación/Validación	Ref.
FK506	Aptasensor fluorescente	Plasma	Dilución con PBS	-/2.5 nM	7.5–1,000 nM	-	[278]
MPA AcMPAG MPAG	CE	Suero	LLE: Acetato de etilo	100/- 100/- 420/-	400–55,300 400–20,000 5000–267,000	-	[283]

*LLOQ. AcMPAG: acil glucuronido del ácido micofenólico; APCI: ionización química a presión atmosférica; CBS: spray de hoja recubierta; CE: electroforesis capilar; CMIA: inmunoensayo quimioluminiscente con micropartículas; CsA: ciclosporina A; DBS: manchas de sangre seca ; ESI: ionización por electrospray; Eve: everolimus; FK506: tacrolimus; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; LC: cromatografía líquida; LDTD: desorción térmica mediante diodo laser; LLOQ: límite inferior de cuantificación; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; LR: rango lineal; MeOH: metanol; MOI: interfaz microfluidica abierta; MeCN: acetonitrilo; MPA: ácido micofenólico; MPAG: glucuronido del ácido micofenólico; MS: espectrometría de masa; NaOAc: acetato de sodio; PP: precipitación de proteínas; PS: ionización de spray de papel; Sir: Sirolimus; SPME: microextracción en fase sólida; WB: sangre entera.

V. OBJETIVOS GENERALES

La correcta recuperación de un paciente transplantado depende, en gran medida, de la administración de unos niveles adecuados del inmunosupresor. Por ello, la monitorización terapéutica de estos fármacos (TDM) es una herramienta indispensable y eficaz para mejorar los resultados clínicos de los pacientes, minimizando sus efectos adversos y aumentando la efectividad de los tratamientos. En consecuencia, es necesario aprovechar adecuadamente los métodos analíticos existentes, así como el desarrollo de nuevos métodos de análisis para la detección de estos analitos de forma fiable.

Los métodos de cribado, como son los inmunoensayos, poseen grandes ventajas para su uso en TDM. Sin embargo, debido al origen animal de los Abs empleados, se ha planteado la necesidad de encontrar nuevos elementos de reconocimiento como alternativa a los tradicionales Abs.

El presente trabajo se enmarca dentro de la labor interdisciplinar que el Grupo de Sensores Optoquímicos y Laboratorio de Fotoquímica Aplicada, perteneciente a los departamentos de Química Analítica y Química Orgánica de la Universidad Complutense de Madrid, viene desarrollando en el campo de nuevas tecnologías de análisis con detección bioluminiscente para la determinación de analitos de particular relevancia tanto en el sector clínico, agroalimentario y medio ambiental.

Parte de esta Tesis Doctoral se ha realizado en el marco de un Proyecto del VII Programa Marco, subvencionado por la U.E. El proyecto titulado, “*NANOphtonic DEvice for Multiple therapeutic drug monitoring*”: NANODEM (Ref. FP7-ICT-2011-8) ha tenido como objetivo el desarrollo de un dispositivo de análisis *in situ* dedicado a la medición de inmunosupresores y sus metabolitos en pacientes trasplantados. En dicho proyecto se pretendía conseguir una monitorización continua de los ISDs usando un catéter intravenoso y una detección óptica.

Con este fin, se plantearon los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral:

1. Desarrollo de inmunoensayos de tipo competitivos basados en polarización de fluorescencia para la detección de ISDs empleando análogos luminiscentes de los fármacos, sintetizados en el grupo de investigación.

- 1.1. Evaluación de la idoneidad de los análogos fluorescentes para su aplicación como antígenos fluorescentes en los inmunoensayos planeados.
- 1.2. Validación y aplicación del inmunoensayo al análisis de muestras de suero sanguíneo de una paciente trasplantada y otra sana.
2. Desarrollo de bioensayos basados en un receptor FKBP1A, selectivo al FK506, como alternativa al uso de Abs.
 - 2.1. Diseño y producción de las proteínas de fusión formadas por el receptor FKBP1A y proteínas fluorescentes. Caracterización espectroscópica de las proteínas sintetizadas, así como la interacción con el fármaco FK506 mediante microbalanza de cuarzo y resonancia magnética nuclear.
 - 2.2. Desarrollo de un fluoroensayo de tipo competitivo empleando partículas magnéticas funcionalizadas con un derivado ácido del FK506. Aplicación del bioensayo al análisis de muestras de sangre entera de pacientes tratados con FK506 y comparación con un método comúnmente empleado.
 - 2.3. Desarrollo de un bioensayo de tipo competitivo empleando micromotores poliméricos funcionalizados en su superficie con un derivado ácido del FK506.

La presente Memoria se ha dividido en dos Capítulos correspondientes a los objetivos principales planteados anteriormente. En cada uno de ellos, se recogen los antecedentes del tema propuesto así como los objetivos particulares de cada Capítulo y los resultados más relevantes obtenidos en cada caso.

**VI. DESARROLLO DE UN
INMUNOENSAYO BASADO EN
MEDIDAS DE POLARIZACIÓN DE
FLUORESCENCIA PARA LA
DETECCIÓN DE
INMUNOSUPRESORES EN SUERO
SANGUÍNEO**

1. Introducción

Como ya se discutió en el Capítulo IV, el seguimiento terapéutico de los medicamentos (TDM) es esencial para que los fármacos con una ventana o intervalo terapéutico estrecho sean administrados a cada paciente, de forma que alcancen la máxima eficacia con los mínimos efectos adversos. Un grupo de medicamentos que precisan TDM son los inmunosupresores, empleados en pacientes sometidos a trasplantes de órganos, para los que se han observado grandes variaciones de absorción, tanto inter- como intra- individuo. De hecho, la variabilidad en este proceso da lugar a la aparición de niveles impredecibles en sangre²⁸⁵ que pueden ser tóxicos, cuando la concentración administrada es superior a la requerida por el paciente, o causar rechazo del órgano trasplantado, cuando se emplean concentraciones demasiado bajas.

Actualmente, la cromatografía líquida (LC) con detección de matriz de diodos (DAD), fluorescencia (FLD) o espectrometría de masas (MS) son las técnicas analíticas de elección en los laboratorios clínicos para la determinación de los diferentes inmunosupresores libres.^{46,216,239} Si bien todas estas técnicas proporcionan métodos sensibles y reproducibles, requieren personal debidamente capacitado, su coste es elevado y, además del tiempo requerido para la separación cromatográfica, algunos métodos requieren pasos adicionales de extracción y derivación, incrementando aún más los tiempos de análisis. Por lo tanto, no son muy adecuadas para la vigilancia semicontinua en dispositivos POCT ni para el cribado de alto rendimiento.

Para solventar estos inconvenientes y disponer de análisis rápidos, fiables y semiautomatizados, los laboratorios clínicos utilizan diferentes inmunoensayos de rutina. No obstante, estos ensayos pueden verse afectados por sobreestimaciones positivas de la concentración del analito, debido a la reactividad cruzada de metabolitos presentes en la muestra.^{234,6}

1.1. Polarización de fluorescencia

La polarización de fluorescencia (FP, del inglés *fluorescence polarization*) es una técnica utilizada extensamente para estudiar interacciones moleculares, actividades

enzimáticas o la hibridación de ácidos nucleicos, de forma rápida y cuantitativa. El principio de los ensayos de polarización de fluorescencia se basa en el hecho que al excitar una molécula con luz polarizada, la emisión se produce en ese mismo plano de polarización si la molécula se encuentra fija; sin embargo, en disolución las moléculas van a rotar durante el tiempo de vida del estado excitado, emitiendo en un plano diferente y dando lugar a una despolarización.

El grado de polarización se expresa en términos de polarización de fluorescencia (P) o de anisotropía de fluorescencia (r), de acuerdo con las siguientes ecuaciones:²⁸⁶

$$mP = 10^{-3}P = 10^{-3} \frac{(F_{\parallel} - F_{\perp})}{(F_{\parallel} + F_{\perp})} \quad (5)$$

$$r = \frac{(F_{\parallel} - F_{\perp})}{(F_{\parallel} + 2F_{\perp})} \quad (6)$$

donde F_{\parallel} es la intensidad de fluorescencia paralela al plano de la luz de excitación y F_{\perp} es la intensidad de fluorescencia perpendicular al plano de la luz de excitación.

La ecuación de Perrin de la teoría del movimiento browniano (7) muestra la relación entre P , el tiempo de vida de fluorescencia y el movimiento molecular del fluoróforo:²⁸⁷

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{3\tau}{\rho}\right) \quad (7)$$

donde P_0 es la polarización límite experimental (su valor máximo teórico es 0.4), τ es el tiempo de vida de fluorescencia de la molécula y ρ está definido como el tiempo que tarda la molécula en rotar un ángulo θ de 68.5° . Si τ es constante, la P va a depender exclusivamente del tiempo de relajación rotacional de la molécula:

$$\rho = \frac{3 \eta V}{R T} \quad (8)$$

donde V es el volumen molecular de la molécula que rota, R es la constante de Boltzmann de los gases ideales, η es la viscosidad y T la temperatura, por lo que las condiciones experimentales van a afectar a la polarización de la fluorescencia. Si se mantienen constantes la viscosidad y la temperatura durante el ensayo, la polarización de fluorescencia va a ser un indicador directo del tamaño de la proteína fluorescente,

pudiendo monitorizar los cambios del volumen molecular debidos a interacciones con otras moléculas.

Los inmunoensayos basados en polarización de fluorescencia (FPIA, del inglés *fluorescence polarization immunoassays*) se utilizan en la actualidad para la determinación de algunos ISDs, tales como el everolimus (Seradyn Innofluor Certican[®] FPIA)²⁸⁸ o la ciclosporina A.²⁸⁹ Este tipo de ensayos homogéneos están basados en la competición que se produce entre el antígeno marcado con una sonda fluorescente, que puede experimentar anisotropía de fluorescencia, y el analito por los sitios de unión al Ab. Al aumentar la concentración del inmunosupresor en la muestra, aumenta la concentración de antígeno marcado libre en disolución, que recupera la libertad de rotación lo que se traduce en una disminución de la polarización de fluorescencia.

Los inmunoensayos basados en FP presentan una serie de ventajas, entre las que destaca la posibilidad de distinguir entre la proporción de moléculas libres y unidas al Ab sin necesidad de separación. Esta característica le confiere una excelente capacidad para la automatización, como se ha demostrado al aplicar la tecnología FPIA al análisis de moléculas pequeñas de interés clínico empleando analizadores comerciales, como el Abbott IMx[®].³⁰ Además, dado que el valor de la polarización es el cociente de las intensidades de fluorescencia ortogonales, no es sensible a las interferencias de absorción. Una gran desventaja asociada a los FPIA convencionales, son los límites de detección relativamente altos que se obtienen para algunos analitos,¹³⁴ especialmente cuando se emplea fluoresceína como marcador fluorescente. Aunque este fluoróforo exhibe un rendimiento cuántico de emisión elevado ($\phi_f = 0.93$),¹³⁰ la sensibilidad del ensayo es generalmente baja debido a su escasa fotoestabilidad y a la luz interferente producida por la matriz (especies que absorben a la misma longitud de onda que la fluoresceína, emisión Ramán y dispersión Rayleigh, principalmente).²⁹⁰

1.2. Marcadores fluorescentes alternativos a fluoresceína para FPIA

La sustitución de la fluoresceína por marcadores fotoestables, que absorban y emitan en la región infrarroja cercana (650 – 900 nm), debería mejorar los límites de detección obtenidos con esta técnica.²⁹¹⁻²⁹³ La ventaja de estos compuestos es que

permiten realizar mediciones en la llamada "ventana biológica", un intervalo de longitudes de onda que incluye la región de 650 – 900 nm. Esta zona se considera una ventana "libre" de interferencias ópticas en las muestras biológicas, ya que biomoléculas como la hemoglobina, ciertos aminoácidos como la fenilalanina, la tirosina y el triptófano, o cofactores como el FAD o el NADH que absorben o emiten luz en la región UV-Vis, son ópticamente inertes en ese intervalo.²⁹¹ También la intensidad de la luz dispersada es menor en la zona rojo-NIR que en el UV-Vis debido a su dependencia inversa con la 4ª potencia de la longitud de onda utilizada para la excitación.

Entre los candidatos potenciales para esta aplicación destacan los fluoróforos derivados de la cianina. Estos compuestos, cargados positivamente, contienen dos anillos aromáticos o heterocíclicos (aromáticos o no) unidos por una cadena polimetínica que conecta dos átomos de N terminales y una carga positiva deslocalizada a lo largo de la estructura (**Figura 15**). Las cianinas ofrecen numerosas ventajas sobre otros colorantes fluorescentes. Por ejemplo, estos cromóforos presentan bandas de absorción y emisión estrechas y altos coeficientes de absorción y rendimiento cuántico. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de estos marcadores es su limitada fotoestabilidad.²⁹⁴

Como alternativa a las cianinas se pueden emplear benzoxazinas, compuestos luminiscentes que contienen un anillo de 6 miembros con un átomo de oxígeno y otro de nitrógeno (generalmente en posiciones 1,4) y dos o más anillos aromáticos de 6 miembros benzocondensados. Estos últimos poseen sendos átomos de N de tipo amina conjugados entre sí (**Figura 15**). Estas moléculas presentan una estructura aromática (y por tanto, más rígida) que les proporciona una mayor fotoestabilidad y un alto rendimiento cuántico de emisión, Φ_f , con un máximo a longitudes de onda >650 nm. La benzofenoxazina fluorescente más utilizada es el Azul Nilo (NB, del inglés *Nile Blue*), con un Φ_f de 0.27 en etanol.²⁹⁵ Gómez-Hens y col.²⁹⁶ demostró la idoneidad del NB para la detección del antibiótico amikacina en muestras de suero humano, con una excelente sensibilidad e interferencias debidas a la dispersión de la luz mínimas, empleando un inmunoensayo basado en medidas de anisotropía de fluorescencia.

Otro grupo de fluoróforos que también se han empleado para este fin incluye al Amarillo Lucifer (LY, del inglés *Lucifer Yellow*) y sus derivados. Estos compuestos están

formados por una estructura sulfonada de tipo 4-amino-1,8-naftalimida con un sustituyente variable en el nitrógeno imida (**Figura 15**). Son solubles en agua y las disoluciones son estables durante varios meses a temperatura ambiente. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia son del orden de 0.25, y los máximos de excitación y emisión están en torno a 430 nm y 530 nm, respectivamente.²⁹⁷⁻²⁹⁹ El LY presenta un gran desplazamiento de Stokes, su respuesta es independiente del pH,³⁰⁰ ha sido aplicado en ensayos de FPIA³⁰¹ y se emplea como alternativa a la fluoresceína en ensayos de marcaje celular.³⁰²

Los denominados fluoróforos de trianguleno son otra opción que ha sido aplicada a ensayos de unión de biomoléculas basados en FP.^{303,304} Se trata de compuestos pertenecientes a la familia de compuestos orgánicos catiónicos de triarilcarbenio,³⁰⁵ que se caracterizan por tener una estructura triangular plana que da lugar a su nombre (**Figura 15**) y emiten en el rojo.³⁰⁴ Son compuestos altamente estables en disolución pese al carácter catiónico de su átomo central de carbono.³⁰⁶ Presentan tiempos largos de emisión (5 - 25 ns) y muestran rendimientos cuánticos de fluorescencia del orden de 0.5, aunque alguno de ellos pueden llegar a 0.7.³⁰⁷

Se ha propuesto también el empleo de complejos de metales de transición (**Figura 15**) (ej. rutenio, osmio y renio), los cuales emiten en el intervalo de 630 a 700 nm, con tiempos de vida largos y elevados rendimientos cuánticos.³⁰⁸ Una ventaja de estos fluoróforos, es que permiten marcar compuestos de alto peso molecular, tales como las gliadinas²⁹⁶ o la HSA³⁰⁹ y para estudiar la unión entre carbohidratos y lectinas.³¹⁰

Otros fluoróforos utilizados en ensayos basados en FP son derivados de la familia de las rodaminas,^{311,312} de los BODIPY,³¹³⁻³¹⁵ del AlexaFluor,^{316,317} del Verde Oregón (del inglés *Oregon Green*),³¹⁸ o de compuestos como el nitrobenzoxadiazol.^{314,319}

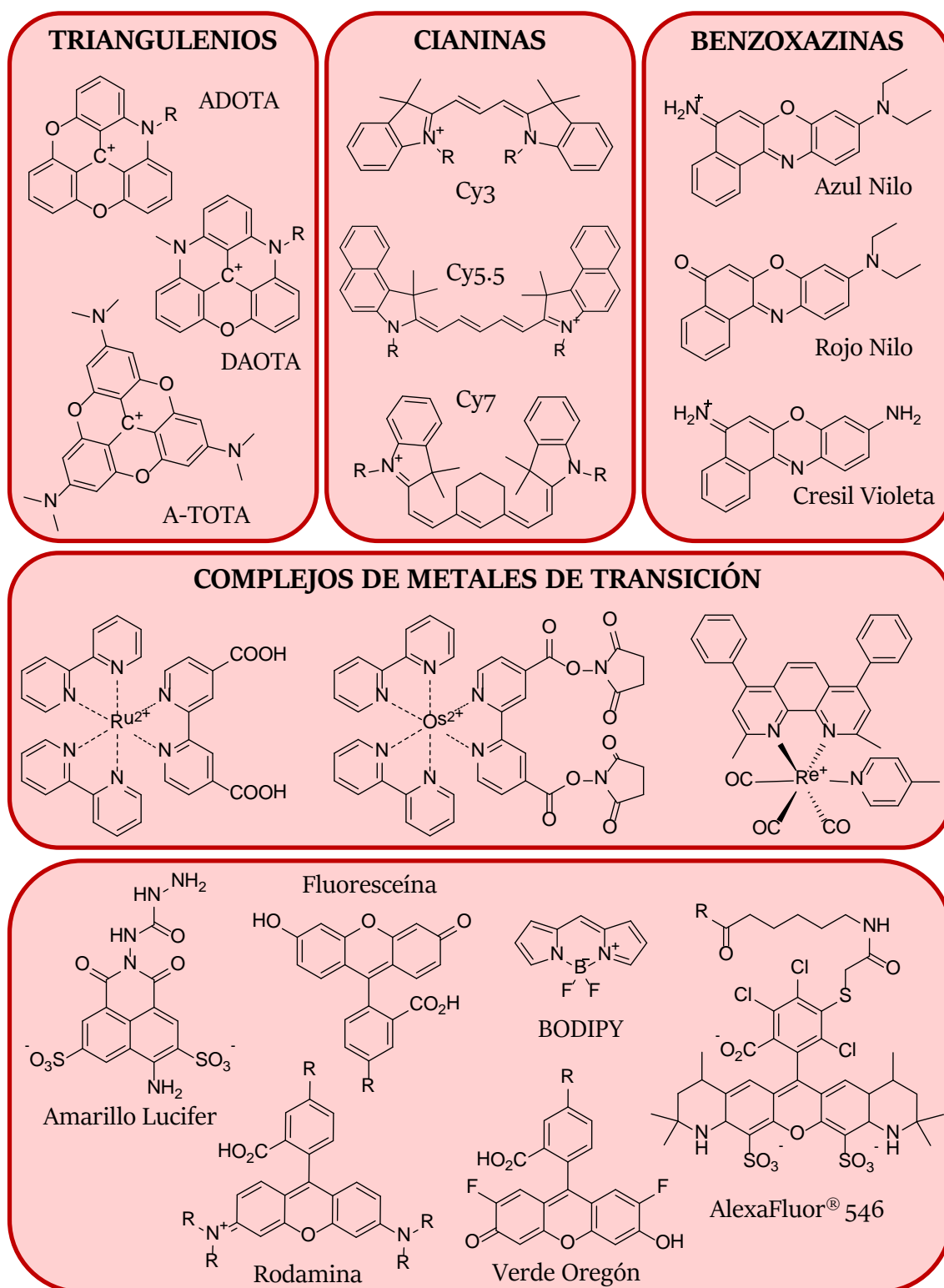


Figura 15. Estructura química algunos fluoróforos empleados en ensayos de FP.

Actualmente se está investigando el empleo de nanopartículas en ensayos de polarización,³²⁰ aunque en algunos casos se trata todavía de pruebas de concepto. Como material fluorescente, los puntos cuánticos (Qdots, del inglés *quantum dots*) muestran

una gran fotoestabilidad, un alto rendimiento cuántico y espectros de fluorescencia estrechos. Se han aplicado, entre otros, en la detección multiplexada de marcadores tumorales,³²¹ junto con oligonucleótidos para detectar ATP³²² o biotinos.³²³ También se han empleado “*nanoclusters*” metálicos como marcadores fluorescentes.³²⁴ Por otro lado, los nanomateriales también pueden usarse para potenciar la polarización de fluorescencia, como es el caso de las láminas de grafeno oxidado³²⁵⁻³²⁷ u óxido de manganeso;³²⁸ las nanopartículas de sílice,^{329,330} oro³³¹ o carbono;³³² o las redes metal-orgánicas.³³³ Estos se emplean por su gran volumen y velocidad de rotación mucho más lenta, restringiendo el movimiento de los fluoróforos empleados en el ensayo.

2. Objetivos

El presente capítulo describe el desarrollo de inmunoensayos basados en medidas de FP para determinar la fracción libre de ISDs, concretamente MPA, FK506 y CsA, en muestras de suero sanguíneo.

Para ello los ISDs se han funcionalizado con el ω -aminoderivado de un colorante de tipo benzo[a]fenoxazina sintetizado en el grupo de investigación, el *N*-(5-((3-aminopropil)amino)-10-metil-9H-benzo[a]fenoxazin-9-iliden)etanaminio (AO), con una estructura semejante a la del NB. Este compuesto presenta fluorescencia en el infrarrojo cercano, y se ha elegido para la preparación de los derivados con ISDs por su facilidad de síntesis y conjugación con grupos carboxílicos (a través del espaciador ω -aminoalquilo del AO), disponibilidad y bajo precio de los precursores, elevada fotoestabilidad, buena solubilidad en agua, alto rendimiento cuántico de fluorescencia y facilidad de purificación. Por otro lado, se ha empleado como marcador un derivado comercial del LY que se ha descrito en la bibliografía como alternativa a la fluoresceína en ensayos de polarización de fluorescencia.^{297,334,335}

Los objetivos específicos planteados en este Capítulo se describen a continuación:

- Evaluar la idoneidad de diferentes conjugados ISDs-AO para su aplicación en ensayos de polarización de fluorescencia.
- Optimización de los parámetros que afectan al ensayo FPIA, incluyendo las concentraciones de los biorreactivos, el tampón de ensayo y los tiempos de incubación.
- Aplicación del ensayo al análisis de muestras reales de plasma sanguíneo.
- Validación de los resultados obtenidos mediante cromatografía líquida de resolución rápida (RRLC, del inglés *Rapid Resolution Liquid Chromatography*) con detección de matriz de diodos (DAD).

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos y disoluciones

Reactivos químicos

- Etanol absoluto, grado HPLC (EtOH, Scharlau).
- Hexafluorofosfato de *N*-óxido de *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin-1-il-metilen]-*N*-metilmetanaminio (HATU, Alfa Aesar).
- *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA, Thermo Fisher Scientific).
- Etilendiamina del Amarillo Lucifer (LYen, Molecular Probes).
- Ácido fórmico (Farmitalia Carlo Erba).
- Tween[®] 20 (T20, Fluka).
- *N,N*-dimetilformamida (DMF, Acros Organic).
- Ácido trifluoroacético (TFA, Fluorochem).
- Acetonitrilo, grado HPLC (MeCN, Thermo Fisher Scientific).
- Dimetil sulfoxido anhidro (DMSO, VWR).

Inmunosupresores y derivados

- Ácido micofenólico (MPA, Alfa Aesar).
- Ácido 6-((5-(5-carboxi-3-metilpent-2-en-1-il)-6-metoxi-7-metil-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-4-il)oxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2*H*-piran-2-carboxílico (ácido micofenólico β-D-glucurónido, MPAG, Carbosynth).
- Tacrolimus (FK506, Sinoway Industrial).
- Ciclosporina A (CsA, Sinoway Industrial).
- Cloruro de *N*-(5-((3-((*E*)-6-(4-hidroxi-6-metoxi-7-metil-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il)-4-metilhex-4-enamido)propil)amino)-10-metil-9*H*-benzo[*a*]fenoxazin-9-iliden)etanaminio (MPA-AO). Sintetizado en el grupo de investigación GSOLFA en el marco de la Tesis Doctoral de Francesca Salis.³³⁶
- Ácido micofenólico funcionalizado con el colorante 6-amino-2-(2-aminoetil)-1,2-dioxo-2,3-dihidro-1*H*-benzo[*de*]isoquinoleína-5,-disulfonato (MPA-LY). Sintetizado en el curso de la presente Tesis Doctoral.

- Tacrolimus funcionalizado con el colorante *N*-(5-((3-aminopropil)amino)-10-metil-9H-benzo[a]fenoxazin-9-iliden)etanaminio (FK506-AO). Sintetizado en el grupo de investigación GSOLFA en el marco de la Tesis Doctoral de Francesca Salis.³³⁶
- Ciclosporina A funcionalizada con el colorante *N*-(5-((3-aminopropil)amino)-10-metil-9H-benzo[a]fenoxazin-9-iliden)etanaminio (CsA-AO). Sintetizado en el grupo de investigación GSOLFA en el marco de la Tesis Doctoral de Francesca Salis.³³⁶

Las disoluciones stock de los inmunosupresores (2 mg/mL) y los inmunosupresores fluorescentes (1 mg/mL) se prepararon en DMSO y se conservaron a 4 °C. Las disoluciones de calibrado de los diferentes inmunosupresores se preparaban diariamente por dilución de las disoluciones patrón con PBST (10 mmol/L, pH 7.4).

Inmunoreactivos

- Anticuerpo policlonal IgG de oveja anti-MPA (Randox Laboratories).
- Anticuerpo monoclonal IgM de ratón anti-FK506 (Fitzgerald).
- Anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti-CsA (Acris).
- Suero humano tipo AB (Thermo Fisher Scientific).
- Albúmina de suero humano (HSA, Sigma-Aldrich).

Disoluciones reguladoras

- Tampón fosfato salino con Tween[®]20 (PBST, Thermo Fisher Scientific): 10 mmol/L fosfato, 0.138 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 0.05% T20 (v/v), pH 7.5
- Ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES, Thermo Fisher Scientific) con Tween[®]20 (MEST): 10 mmol/L MES, 0.05% T20 (v/v), pH 4.7.
- Tampón tris(hidroximetil)aminometano (Tris, Bio-Rad) con Tween[®]20 (TRIST): 10 mmol/L Tris, 0.05% T20 (v/v), pH 8.
- Tampón carbonato (Riedel-de Haën) con Tween[®]20 (CBT): 10 mmol/L carbonato, 0.05% T20 (v/v), pH 9.4.
- Tampón acetato sódico (Sigma-Aldrich) con Tween[®]20 (AcNaT): 10 mmol/L acetato, 0.05% T20 (v/v), pH 5.2.
- Tampón de bloqueo libre de proteínas Pierce[™] (PFBB, Thermo Fisher Scientific).

- Tampón de bloqueo de caseína en PBS (Thermo Fisher Scientific).

3.2. Instrumentación

3.2.1. Lector de placas

Para los inmunoensayos de FP, se usó un lector de microplacas, BMG LABTECH CLARIOstar configurado para realizar medidas de polarización de fluorescencia. Se emplearon filtros de excitación de 590-50 nm o 430-10 nm, un espejo dicróico de 639 nm o 504 nm y un filtro de emisión de 675-50 nm o 570-100 nm, según se usaran análogos fluorescentes marcados con AO o LY, respectivamente.

Se ajustaron, tanto la ganancia como el enfoque, con un pocillo de referencia que contenía únicamente el analito fluorescente, ajustando la polarización a un valor de referencia de 40 mP.

3.2.2. Espectrofotómetro y fluorímetros

Espectrofotómetro Varian Cary 3 Bio para la realización de espectros de absorción (UV-vis).

Espectrofluorómetro Horiba Fluoromax-4TCSPC equipado con una lámpara de xenón de 150 W como fuente de excitación y un tubo fotomultiplicador R928P, de respuesta extendida al rojo.

3.2.3. Cromatografía

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos de resolución rápida (RRLC) Agilent 1200 (Agilent Technologies) equipado con una bomba binaria, un desgasificador en línea, un sistema de inyección automático, un termostizador de columna, un detector de matriz de diodos integrados (1260 Infinity DAD) y una columna analítica ACE Excel 2 C18-PFP (100 mm × 2.1 mm, 2 μm) de Advanced Chromatography Technologies (Aberdeen, Escocia).

Para la purificación del derivado fluorescente MPA-LY se utilizó un cromatógrafo de líquidos semipreparativo Agilent 1200LC (Agilent Technologies) acoplado a un detector

de matriz de diodos (DAD), una columna Zorbax[®] SB-C18 (9.4 × 250 mm, 5 μm) y un colector de fracciones AS serie 1200.

3.2.4. Otros instrumentos y materiales

- Espectrómetro de masas Bruker HCT Ultra (ESI).
- Microcentrífuga miniSpin (Eppendorf AG).
- Dispositivos de ultrafiltración Amicon[®] Ultra con membrana Ultracell 3K (Merck Millipore).
- Placas multipocillo negras de 96 pocillos OptiPlates (PerkinElmer).
- Sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore).
- Balanza analítica Mettler AT261 DeltaRange[®] con 0.01 mg de sensibilidad.
- Baño de ultrasonidos (P-Selecta, España).
- pH-metro Crison GLP 21.
- Programa de tratamiento y procesado de datos OriginPro 2016, Sigma Plot 11.0 y Microsoft Excel 2016.

3.3. Síntesis de los colorantes fluorescentes

Para eliminar los problemas asociados al uso de la fluoresceína en ensayos de polarización de fluorescencia, se llevó a cabo la síntesis de dos marcadores diferentes: el ω-aminoderivado de un marcador fluorescente de tipo benzo[a]fenoxazina (abreviado como aminoxacina o AO) y la etilendiamina del Amarillo Lucifer (LYen).

3.3.1. Derivados de ISDs marcados con la molécula fluorescente AO

Como se ha indicado anteriormente, los derivados fluorescentes marcados con AO se sintetizaron en el marco de la Tesis Doctoral de Francesca Salis realizada en el grupo de investigación GSOLFA, Universidad Complutense de Madrid.³³⁶ En la **Figura 16** se muestra el esquema de síntesis para cada uno de los ISDs fluorescentes estudiados en esta Tesis, MPA, FK506 y CyA.

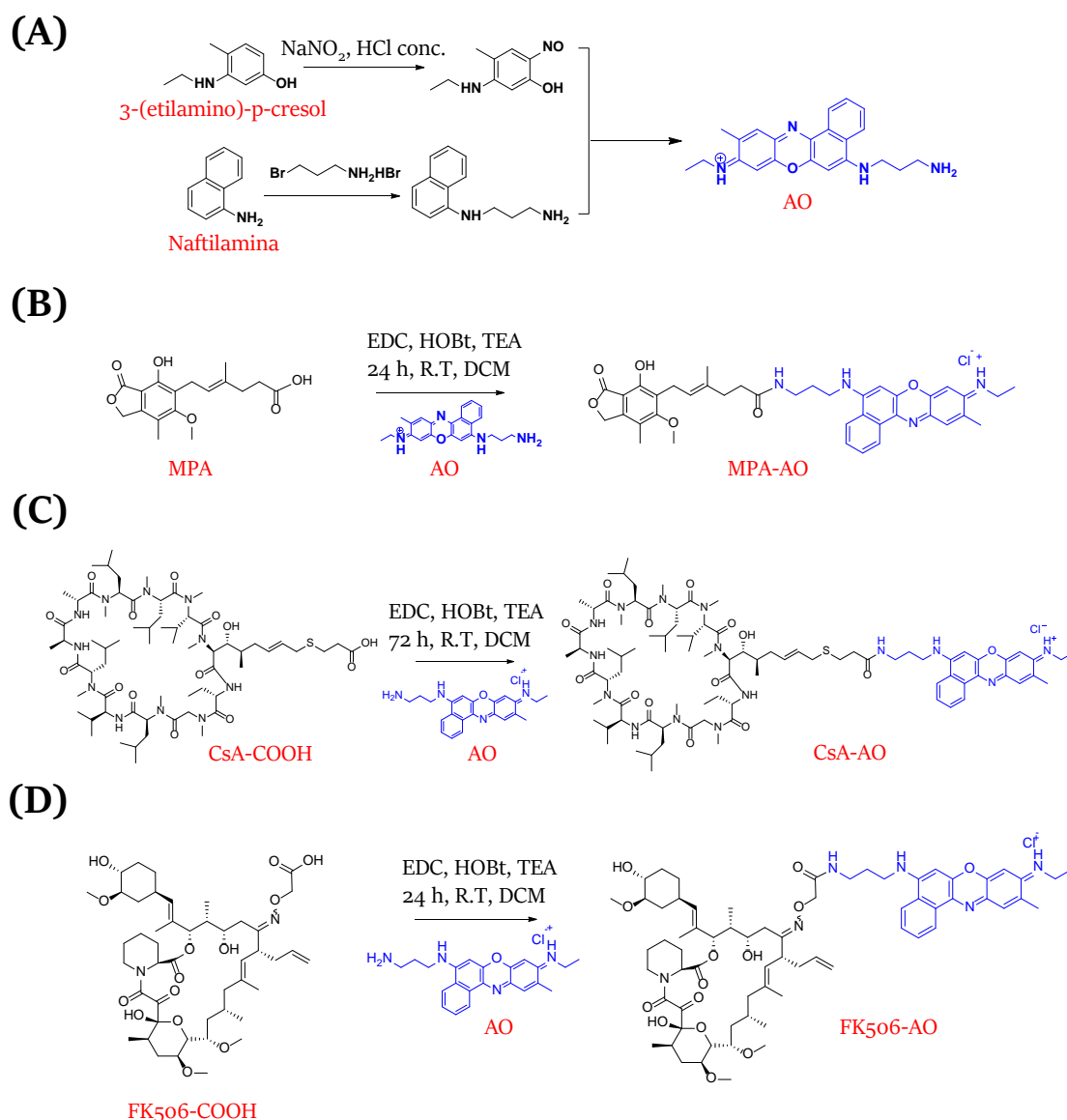


Figura 16. Esquemas de reacción para la síntesis de: (A) el marcador fluorescente AO, (B) MPA-AO, (C) CyA-AO y (D) FK506-AO.

3.3.2. Derivado fluorescente del MPA marcado con LY

Para la derivatización del MPA con LY, se mezclaron 512 μ L de MPA (56 mmol/L en DMF anhidro) con 10 mg de HATU y 17.38 μ L de DIPEA a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó magnéticamente durante 20 min para activar el ácido. A continuación, se añadieron 10.5 mg de LYen y 1.05 mL de DMF anhidro a la disolución de ácido activado. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en atmósfera de nitrógeno y con agitación durante 96 h, pasado este tiempo el crudo de reacción se guardó a 4 °C hasta su purificación.

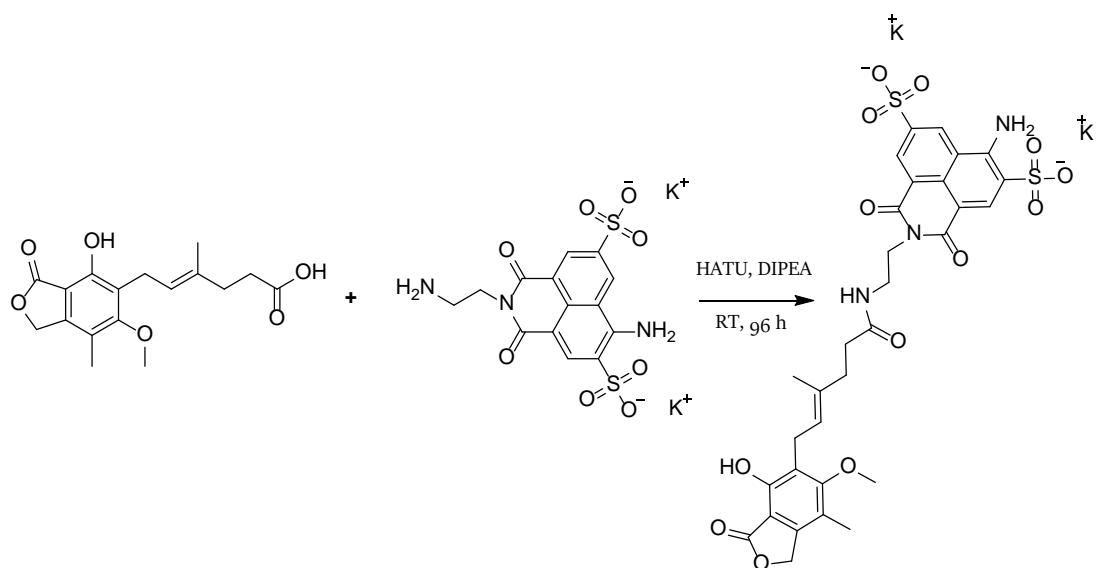


Figura 17. Síntesis del conjugado fluorescente MPA-LY.

La reacción se monitorizó, tomando alícuotas de 5 μL , a tiempo 0, 1, 16, 24 y 96 h. Las alícuotas se diluyeron con 995 μL de agua milliQ y se analizaron por HPLC-FLD-DAD. La separación se llevó a cabo en modo gradiente (**Tabla 7**) con fase móvil agua-TFA (0.1%) (Fase A) y acetonitrilo-TFA (0.1%) (Fase B), un caudal de 1 ml/min, volumen de inyección de 50 μL , termostatación de la columna a 40 $^{\circ}\text{C}$ y detección mediante FLD (λ_{exc} : 428 nm / (λ_{em} : 530 nm) y DAD (λ_{abs} : 304 y 428 nm).

Tabla 7. Gradiente empleado en la separación cromatográfica para monitorizar la formación de MPA-LY.

Tiempo (min)	Fase A	Fase B
0	98	2
2	98	2
17	10	90

El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía líquida semipreparativa en fase inversa, empleando un modo gradiente (**Tabla 8**) y una fase móvil agua-ácido fórmico (1%) (Fase A), acetonitrilo-ácido fórmico (1%) (Fase B) y metanol (Fase C). Para ello, se diluyeron 50 μL del crudo de reacción con 950 μL de agua y se inyectaron 200 μL por cada separación. Las fracciones del producto puro se recolectaron de forma automática, se combinaron y se evaporaron hasta sequedad con un rotavapor.

Tabla 8. Gradiente empleado para la purificación del MPA-LY mediante cromatografía semipreparativa.

Tiempo (min)	Fase A	Fase B	Fase C
0	93	2	5
2	93	2	5
28	5	90	5

3.4. Cálculo del rendimiento cuántico de fluorescencia

El rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre los fotones emitidos a través de la fluorescencia y los fotones absorbidos en el mismo intervalo de tiempo, por lo que se puede considerar como la probabilidad de que el estado excitado se desactive mediante la fluorescencia y no por otros mecanismos no radiativos. El método más empleado para determinar el rendimiento cuántico de fluorescencia es el relativo, en el que se emplea un patrón de referencia y se calcula de acuerdo con la Ecuación 9:³³⁷

$$\Phi_f^i = \Phi_f^s \frac{A_{\lambda_{ex}}^s}{A_{\lambda_{ex}}^i} \frac{\int_{em} F^i}{\int_{em} F^s} \frac{n_i^2}{n_s^2} \quad (9)$$

donde $A_{\lambda_{ex}}$ es la absorbancia de la muestra (i) y del patrón de referencia (s) a la longitud de onda de excitación, F la integral del espectro de fluorescencia y n el índice de refracción de la disolución.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia del AO y del MPA-AO se determinaron en etanol y en tampón fosfato a pH 7.4 usando como patrón de referencia la Oxazina 170 ($\Phi_f = 0.579 \pm 0.032$ en etanol)³³⁷ y excitación a 595 nm. El rendimiento cuántico del MPA-LY se determinó en tampón fosfato a pH 7.4 usando LY ($\Phi_f = 0.27$ en agua)²⁹⁹ como patrón de referencia y excitación a 410 nm. Todas las medidas se realizaron por triplicado y la absorbancia de la disolución se mantuvo por debajo de 0.1 a la longitud de onda de excitación.

3.5. Protocolo de ensayo

Los inmunoensayos de polarización de fluorescencia se llevaron a cabo empleando disoluciones estándar del inmunosupresor, o muestras de suero enriquecidas con éste, en presencia del análogo fluorescente y del Ab selectivo. Para la realización del ensayo, se

mezclaron 20 μL del conjugado fluorescente con 80 μL de las disoluciones patrón, o de las muestras de suero, en una placa multipocillo, previamente bloqueada con 300 μL /pocillo de PFBB durante 1 h. A continuación, se añadieron a la disolución 100 μL de Ab selectivo y, tras una incubación de 20 min a 29 $^{\circ}\text{C}$, se midió el valor de FP. También se midió un blanco utilizando PBST como muestra. El esquema del protocolo de ensayo se muestra en la **Figura 18**.

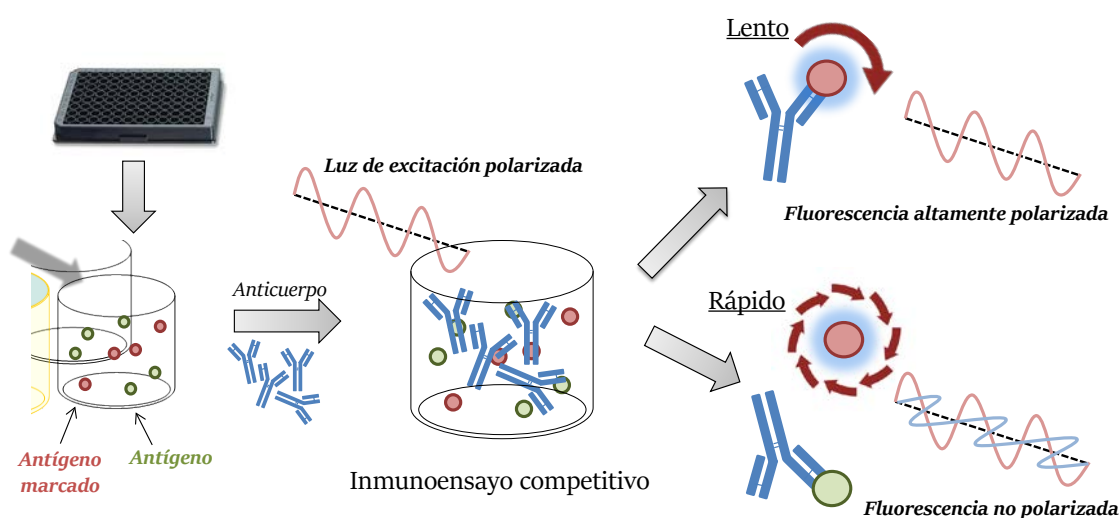


Figura 18 Esquema del protocolo de ensayo. La cuantificación del inmunosupresor se realiza empleando un ensayo competitivo, en el que el analito y un conjugado fluorescente compiten por los sitios de unión del Ab selectivo. Al aumentar la concentración de analito en la muestra, aumenta la concentración de marcador fluorescente libre en disolución y con ello su libertad de rotación con lo que disminuye la señal de la polarización.

Los datos de polarización de fluorescencia obtenidos se representaron como la relación B/B_0 (siendo B y B_0 las señales de polarización de fluorescencia en presencia y ausencia de inmunosupresor, respectivamente), frente al logaritmo de la concentración del inmunosupresor correspondiente, tal como se describió en el apartado 3.4 del Capítulo IV.

La reactividad cruzada frente a otros inmunosupresores o metabolitos secundarios, se determinó calculando el IC_{50} a partir de las curvas de calibrado de los respectivos inmunoensayos de polarización de fluorescencia. Los valores de la CR se calcularon mediante la Ecuación 10:

$$CR(\%) = \frac{IC_{50}^{MPA}}{IC_{50}^{cross-react.}} \times 100 \quad (10)$$

En general, se considera que un compuesto interfiere sensiblemente cuando la CR es igual o superior al 10%, su interferencia es poco importante si la CR se encuentra entre el 1% y el 10% y despreciable si es < 1%.

3.6. Preparación de la muestra

Se usaron dispositivos de ultrafiltración Amicon[®] con un límite de peso molecular nominal de 3 kDa, prelavados con PBST, para aislar el inmunosupresor libre de la muestra biológica. Para ello, en primer lugar, la muestra de sangre se centrifugó a 2000×g durante 15 min a temperatura ambiente. Seguidamente, una alícuota de 500 µL se transfirió al dispositivo de filtrado centrifugándose a 12045×g durante 30 min y el ultrafiltrado obtenido se llevó al volumen inicial. Finalmente, tras una dilución 1/4 con PBST, las muestras se analizaron por FPIA.

3.7. Análisis de muestras de suero

Las muestras de suero (1.5 mL) se fortificaron con MPA a tres niveles de concentración 1, 5 y 10 µg/mL. Las muestras se agitaron durante 3 min y después se centrifugaron a 2000×g durante 15 min. El sobrenadante (500 µL) se transfirió a un dispositivo Amicon[®] para su ultrafiltración y se llevó a cabo el ensayo descrito en el apartado 3.5.

Con el propósito de comparar métodos, las muestras ultrafiltradas se acidificaron con TFA (concentración final 0.1%, v/v) antes del análisis cromatográfico. Se utilizó un programa isocrático para la separación de MPA usando como fase móvil una mezcla de agua (con 0.1% TFA) y acetonitrilo (con 0.1% TFA) (80:20, v/v). Los análisis se realizaron usando un caudal de 0.6 mL/min, una temperatura de la columna de 45 °C y un volumen de inyección de 100 µL. En estas condiciones el MPA eluyó a los 9 min. La longitud de onda del detector DAD se fijó a 304 nm y la cuantificación se realizó mediante calibración externa y mediciones de área de pico.

3.8. Análisis de muestra real

La concentración de MPA libre se determinó en la sangre de una paciente voluntaria de 39 años de edad, trasplantada de corazón, tratada con mofetil micofenolato de forma oral (250 mg dos veces al día). Las muestras de sangre (20 mL) se tomaron 12 h después de la administración del fármaco, y se recogieron en tubos de extracción para hematología que contenían EDTA. También se recolectó sangre de un individuo sano para los controles negativos. Las muestras sanguíneas se centrifugaron a $2000\times g$ durante 15 min a temperatura ambiente para el aislamiento del plasma. A continuación, se ultrafiltraron 500 μL del sobrenadante a $12045\times g$ durante 30 min en dispositivos Amicon[®] 3K prelavados con PBST, y las muestras extraídas del plasma se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis. Las medidas de MPA libre se realizaron empleando FPIA, tras una dilución 1/4 con PBST, y los resultados se compararon con los obtenidos por RRLC-DAD tras acidificar la muestra con TFA (concentración final 0.1%, v/v), sin diluciones adicionales.

4. Resultados y discusión

4.1. Purificación de MPA-LY

La monitorización de la reacción de formación del conjugado fluorescente MPA-LY se llevó a cabo empleando HPLC-DAD/FLD. En la **Figura 19** se muestran los cromatogramas obtenidos tras distintos tiempos de reacción. En ambos casos se observa un pico a un tiempo de retención de 13.5 min cuyo área aumenta con el tiempo de reacción, que puede corresponder al producto MPA-LY. En la **Figura 19B**, se puede observar como el área del pico correspondiente al MPA libre (tiempo de retención 15 min) disminuye según avanza la reacción y se produce la formación del derivado fluorescente.

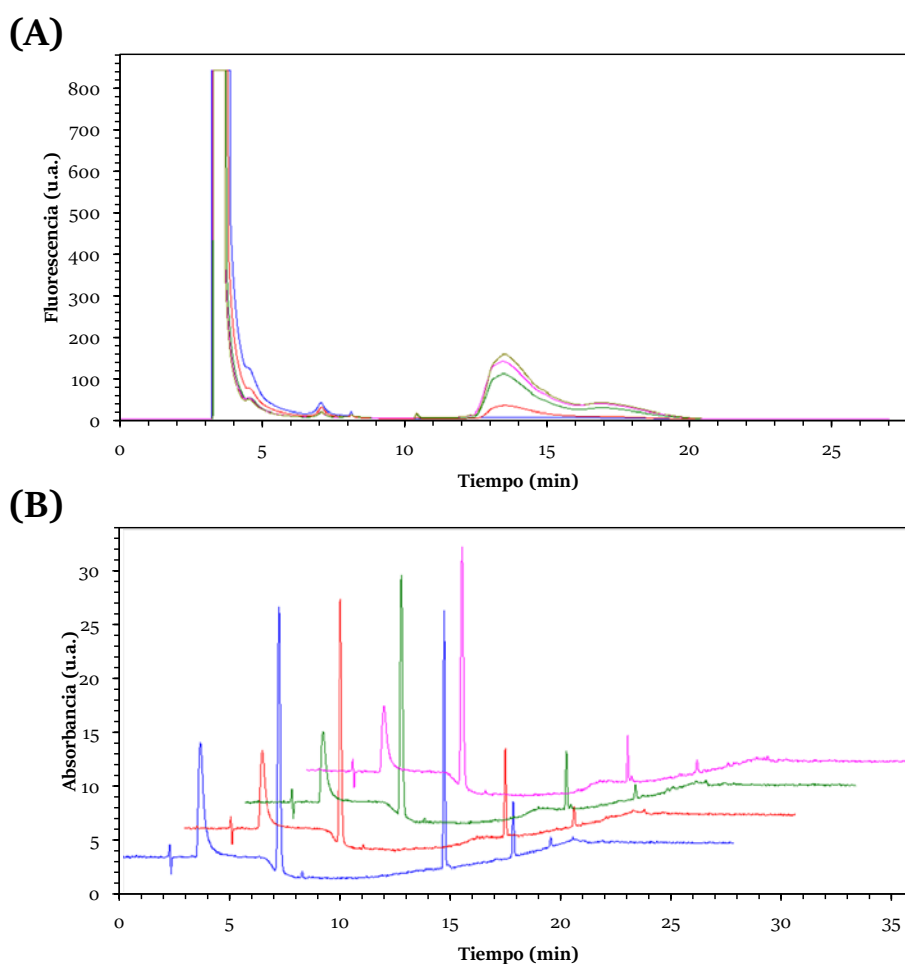


Figura 19. Cromatogramas del crudo de reacción a diferentes tiempos. **(A)** Monitorización de la fluorescencia a 428 nm transcurridos los siguientes tiempos de reacción: 0 h (azul), 1 h (rojo), 16 h (verde), 24 h (rosa), 96 h (verde pistacho). **(B)** Monitorización de la absorbancia a 304 nm a los tiempos de reacción: 1 h (azul), 16 h (rojo), 24 h (verde), 96 h (rosa).

El extracto puro, obtenido mediante cromatografía semipreparativa, se analizó mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización ESI(-) para confirmar la obtención del producto buscado. En la **Figura 20** se muestra el espectro de masas ESI(-) obtenido en estas condiciones, con la asignación de las señales más intensas que confirman la obtención del derivado buscado.

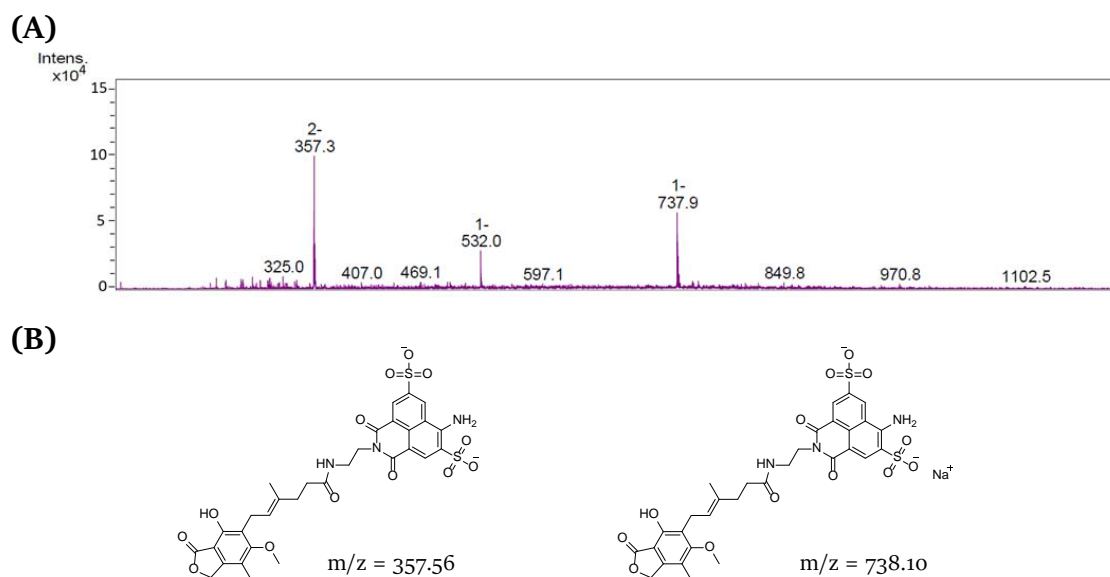


Figura 20. (A) Espectro de masas del compuesto de tiempo de retención 13.5 min purificado añadiendo un 1% de ácido fórmico en el medio de separación cromatográfica. (B) Asignación de los picos más importantes.

4.2. Caracterización espectroscópica de los inmunosupresores marcados con una sonda fluorescente

4.2.1. Caracterización fotoquímica

La caracterización espectroscópica de los derivados fluorescentes de los inmunosupresores se realizó empleando las técnicas de espectroscopia de absorción y emisión de fluorescencia.

En la **Figura 21** se muestran los espectros correspondientes a los nuevos derivados de MPA, FK506 y CsA, en EtOH y en PBS a pH fisiológico. En la **Tabla 9** se recogen los parámetros espectroscópicos más relevantes de dichos conjugados.

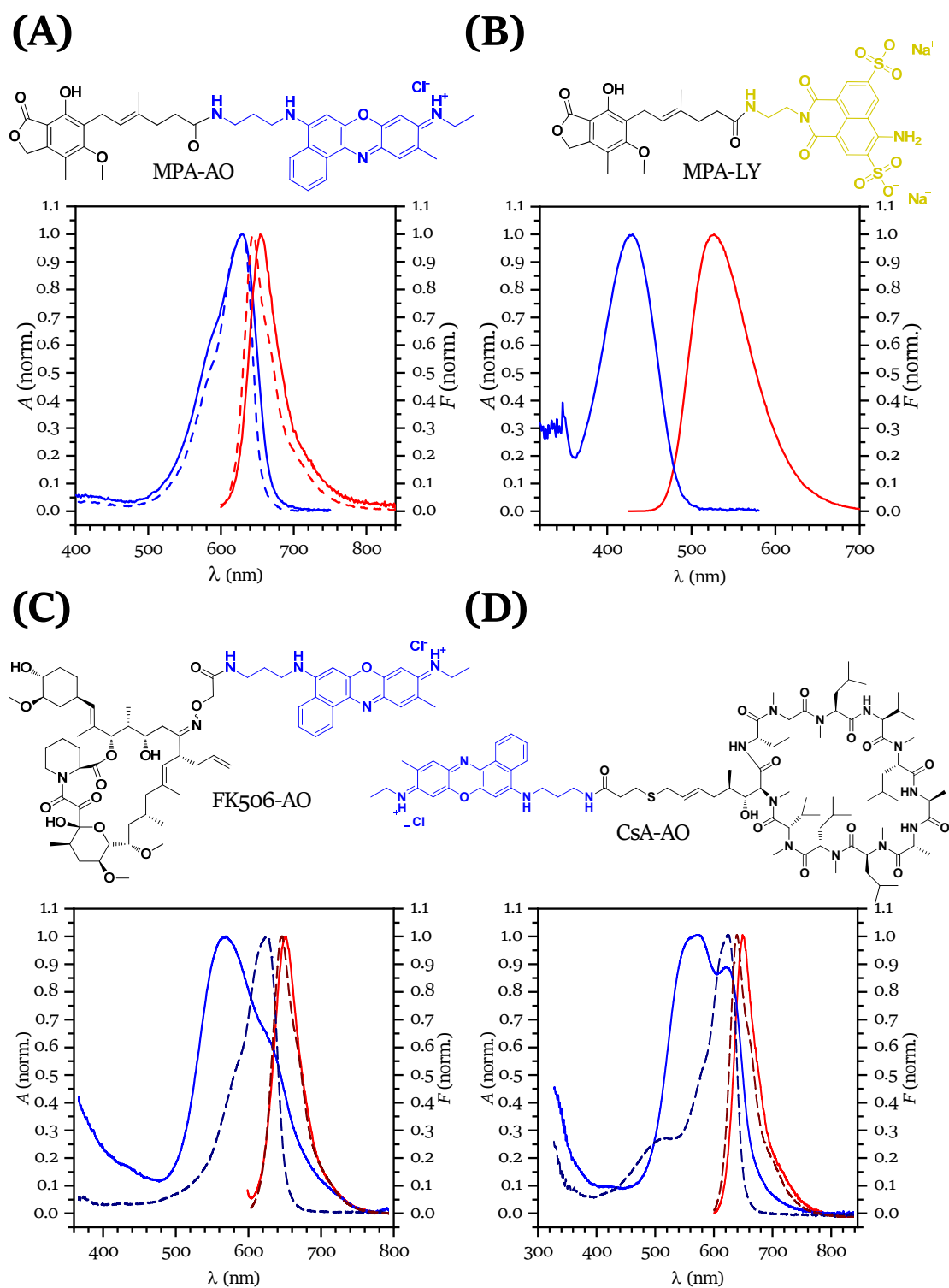


Figura 21. Estructura química y espectros normalizados de absorción (azul) y emisión (rojo) en etanol (línea punteada) y en PBS a pH 7.4 (línea sólida) del **(A)** MPA-AO (4 $\mu\text{mol/L}$), **(B)** MPA-LY (97 $\mu\text{mol/L}$), **(C)** FK506-AO³³⁶ (100 nmol/L), **(D)** CsA-AO³³⁶ (100 nmol/L).

En el caso del MPA-AO, los máximos de absorción en PBS y etanol son prácticamente iguales y están centrados a 629 nm, mientras que los máximos de emisión

son de 644 y 654 nm en etanol y PBS, respectivamente. El rendimiento cuántico de emisión en etanol es $\Phi_f = 0.48 \pm 0.05$, disminuyendo en PBS, $\Phi_f = 0.16 \pm 0.02$. No obstante, la fluorescencia sigue siendo lo suficientemente intensa para la aplicación de esta sonda en dicho medio. Este dato es destacable, ya que en el caso del Azul Nilo a pesar de presentar una intensa emisión en medios orgánicos ($\Phi_f = 0.27$ en etanol), su rendimiento cuántico de fluorescencia en disolución acuosa disminuye hasta 0.01, debido a la eficiente transferencia protónica desde disolvente al estado excitado del colorante, lo que limita su aplicación en medios acuosos.³³⁸ Los resultados obtenidos para el MPA-AO se correlacionan con los obtenidos para el marcador AO libre: $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}/\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ de 630/642 nm y 624/677 nm en etanol y PBS (pH 7.4), respectivamente, con un Φ_f de 0.55 en etanol y 0.18 en PBS.

Tabla 9. Características espectroscópicas de los conjugados fluorescentes de los ISDs en tampón fosfato a 25 °C.

Conjugado fluorescente	PBS		
	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	Φ_f
MPA-AO	629	654	0.16
FK506-AO	627	658	n. d.
CyA-AO	579	654	n. d.
MPA-LY	428	530	0.20

Los espectros normalizados de absorción y emisión del inmunosupresor MPA-AO en ambos disolventes (**Figura 21A**) son muy similares, algo que no ocurre con los análogos fluorescentes del FK506 y la CsA. Este comportamiento podría deberse a que el conjugado MPA-AO no sufre procesos de agregación en disolución acuosa a los niveles de concentración ensayados (nanomolar-micromolar). Este hecho supone una ventaja, ya que la solubilidad del marcador en medio acuoso es un factor determinante para desarrollar bioensayos reproducibles, dado que las sondas NIR son habitualmente moléculas grandes, planas e hidrófobas y propensas a la agregación en el agua. Por ejemplo, Burgess y col.³³⁹ han descrito la síntesis de derivados de NB solubles en agua (a concentraciones del orden de 4 μM). Según los autores, dichas sondas muestran espectros de absorción y emisión similares en metanol y en PBS, como se observa para el

conjugado MPA-AO empleado en la presente Tesis Doctoral, con máximos de $\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}}$ de 628/662 nm en metanol, y de 630/671 nm en PBS, siendo el rendimiento cuántico de emisión de 0.56 en metanol y 0.14 en PBS, respectivamente.

4.2.2. Ensayos de interacción de los conjugados de MPA con albúmina de suero humano

La idoneidad de los diferentes trazadores para su aplicación en medidas de FP se evaluó realizando ensayos de saturación con una cantidad fija del conjugado fluorescente y concentraciones crecientes de HSA como proteína modelo a la que los inmunosupresores se unen de forma significativa.⁴⁶

De manera individual, los conjugados fluorescentes (20 μL , 10 nmol/L MPA-AO y 74 nmol/L MPA-LY) se mezclaron con 80 μL de PBST en una placa multipocillo, previamente bloqueada con 300 μL /pocillo de PFBB durante 1 h. A continuación, se añadieron alícuotas de 100 μL de HSA (0 – 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y, tras una incubación de 20 min a 29 °C, se midió el valor de la FP.

Como se muestra en la **Figura 22**, la FP del MPA-AO aumenta 10 veces con respecto a la señal inicial, hasta un valor de aproximadamente 250 mP, cuando se encuentra completamente unido a la proteína. En el caso del MPA-LY el incremento observado en la señal de polarización fue menor, aproximadamente 4 veces sobre la señal inicial, alcanzándose la saturación para concentraciones de HSA superiores a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ello indica que la constante de unión del MPA-LY ($\sim 195 \text{ mM}^{-1}$) a la HSA es mayor que la del MPA-AO ($\sim 22 \text{ mM}^{-1}$), pero que la unión del primero permite una mayor movilidad del trazador fluorescente, lo que probablemente se debe a su diferente carga, al tamaño de los grupos sulfonato y/o a la solvatación eficaz de éstos por el agua.³⁴⁰

Teniendo en cuenta que el máximo teórico obtenido para un fluoróforo unido, sin posibilidad de movimiento y orientación aleatoria, es de 400 mP;³⁰ los resultados obtenidos para ambos compuestos demuestran que el movimiento libre de las sondas fluorescentes se encuentra lo suficientemente restringido como para producir una alta polarización cuando el conjugado está unido a la HSA.

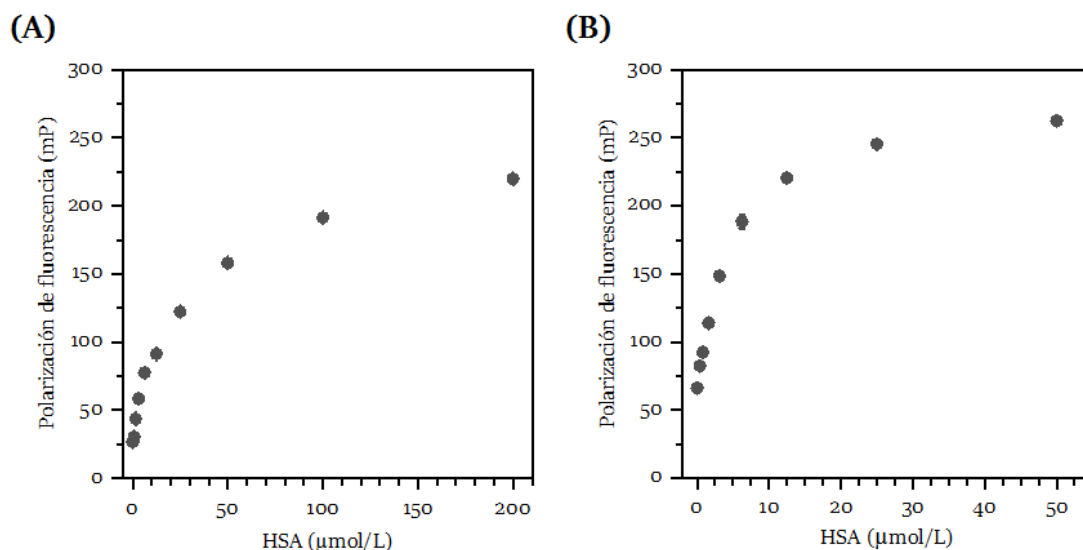


Figura 22. Ensayo de saturación para: **(A)** MPA-AO (1 nmol/L) con HSA (0 - 400 μg/mL) y, **(B)** MPA-LY (7.4 nmol/L) con HSA (0 - 100 μg/mL), en tampón PBST a 29 °C tras una incubación de 20 min. Los resultados se muestran como la media de las señales ± el error estándar de la media (n = 3).

Las constantes de disociación (K_D) de estos compuestos se obtuvieron al ajustar los datos experimentales a la ecuación de Hill (11):^{341,342}

$$f(x) = \frac{a \cdot x^h}{K_D^h + x^h} \quad (11)$$

donde a es la señal máxima, h es el denominado coeficiente de Hill y K_D es la constante de disociación. Las constantes obtenidas para los trazadores MPA-AO y MPA-LY fueron de $45 \pm 10 \mu\text{mol/L}$ y $5.1 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$, respectivamente.

4.3. Optimización de la concentración de los inmunoreactivos

Uno de los factores limitantes cuando se emplean antígenos marcados con sondas fluorescentes en inmunoensayos, es la unión al parátipo del Ab selectivo al analito.²⁸⁹ Por ello, se evaluó la avidéz de los diferentes conjugados por sus respectivos Abs, así como su especificidad frente a Abs selectivos a otros inmunosupresores.

Como se muestra en la **Figura 23A**, la señal de polarización de fluorescencia del conjugado fluorescente FK506-AO (10 nmol/L) no se modifica en presencia del Ab IgM selectivo a FK506 (25 μg/mL), lo que indicaría que éste no reconoce al análogo fluorescente sintetizado. Cabe destacar que la polarización de fluorescencia medida para el FK506-AO en ausencia de Ab era elevada, muy probablemente debido a su agregación

en las condiciones del ensayo. Este comportamiento no se modificó al variar tanto la concentración de Ab como del fluoróforo (**Figura 23B**). Por todo ello, se descartó la aplicación de este conjugado fluorescente en estos ensayos.

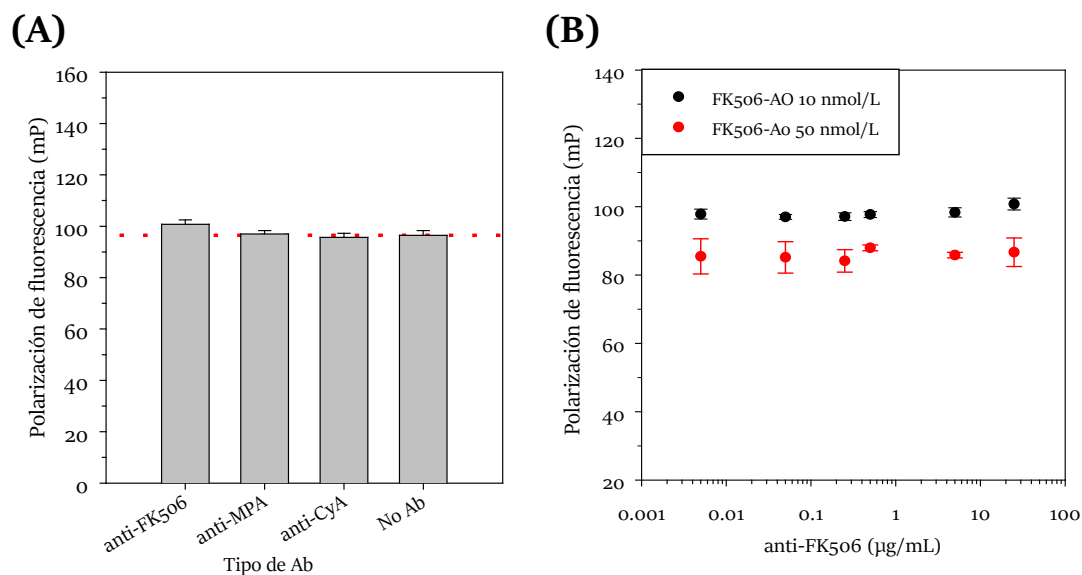


Figura 23. (A) Evaluación de la avidéz y especificidad de unión del conjugado fluorescente FK506-AO (10 nmol/L) frente a los Abs anti-FK506, anti-MPA, anti-CyA (25 µg/mL), y en ausencia de Ab (línea roja), en PBST. (B) Curva de dilución del Ab anti-FK506 frente a FK506-AO (10 y 50 nmol/L). Los resultados se representan como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

En el caso del CsA-AO, al incubar el trazador (10 nmol/L) con el Ab selectivo al inmunosupresor (25 µg/mL) se observó un pequeño aumento de la señal de polarización con respecto a los valores obtenidos en presencia de Abs no selectivos, o en ausencia de Ab (**Figura 24A**). Sin embargo, el intervalo dinámico obtenido era muy estrecho (**Figura 24B**), requiriéndose el empleo de una elevada concentración de Ab anti-CsA para obtener una pequeña variación en la señal de polarización, por lo que también se descartó la aplicación de este ensayo para la cuantificación de CsA.

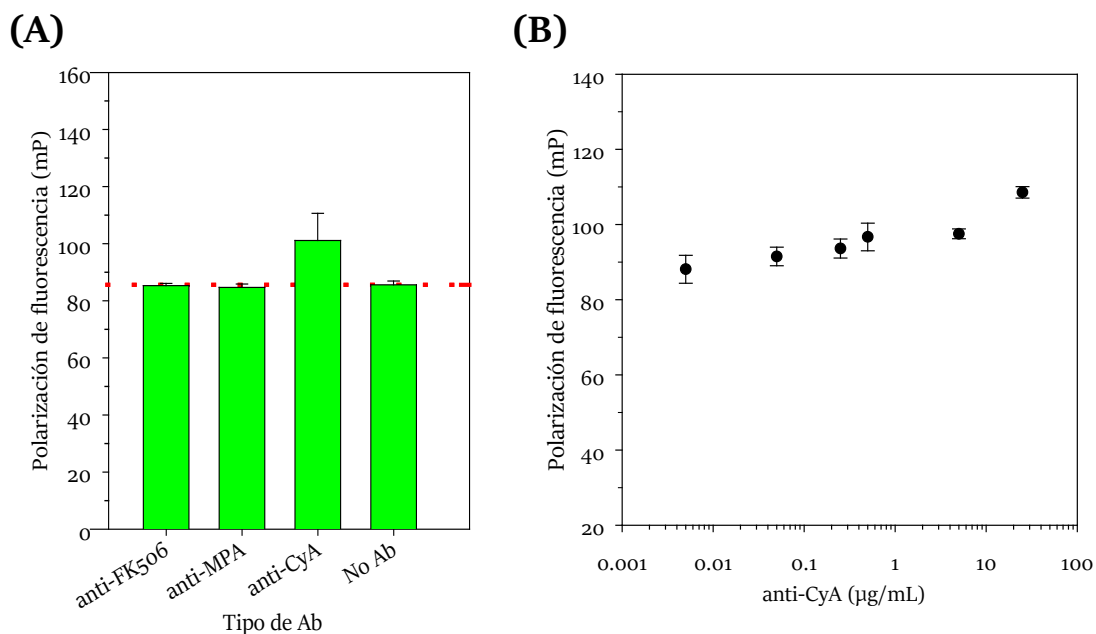


Figura 24. (A) Evaluación de la avidéz y especificidad de unión del conjugado fluorescente CsA-AO (10 nmol/L) frente a los Abs anti-FK506, anti-MPA, anti-CyA (25 $\mu\text{g/mL}$), y en ausencia de Ab (línea roja), en PBST. (B) Curva de dilución del Ab anti-CsA frente a CsA-AO (10 nmol/L). Los resultados se muestran como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

La polarización de fluorescencia medida para el MPA-AO (1 nmol/L) en presencia del Ab específico anti-MPA (25 $\mu\text{g/mL}$) es muy superior a la obtenida tras la interacción de dicho trazador con la proteína modelo HSA (apartado 4.2.2), a la misma concentración. Por otra parte, no se observa reactividad cruzada entre el MPA-AO y los Abs anti-FK506 o anti-CsA (**Figura 25A**), por lo que se seleccionó este trazador para optimizar un ensayo de polarización de fluorescencia para la determinación de MPA.

Para establecer la concentración de Ab anti-MPA y MPA-AO adecuadas para la realización del FPIA se evaluó la curva de dilución de la biomolécula para una concentración fija de derivado fluorescente ($[\text{MPA-AO}] = 1 \text{ nmol/L}$) y una curva de dilución de la sonda fluorescente para una concentración fija de Ab ($[\text{anti-MPA}] = 5 \mu\text{g/mL}$). Los valores de ambos parámetros deben ser optimizados no sólo para la obtención de una buena sensibilidad en el ensayo, sino también para asegurar una adecuada respuesta instrumental.³⁴³

Como se muestra en la **Figura 25B** y **C**, los mejores resultados se obtuvieron empleando concentraciones 1 nmol/L y 5 $\mu\text{g/mL}$ de MPA-AO y anti-MPA, respectivamente, dado que esa combinación proporcionaba una buena sensibilidad y

precisión, así como un intervalo dinámico adecuado para la determinación del inmunosupresor.

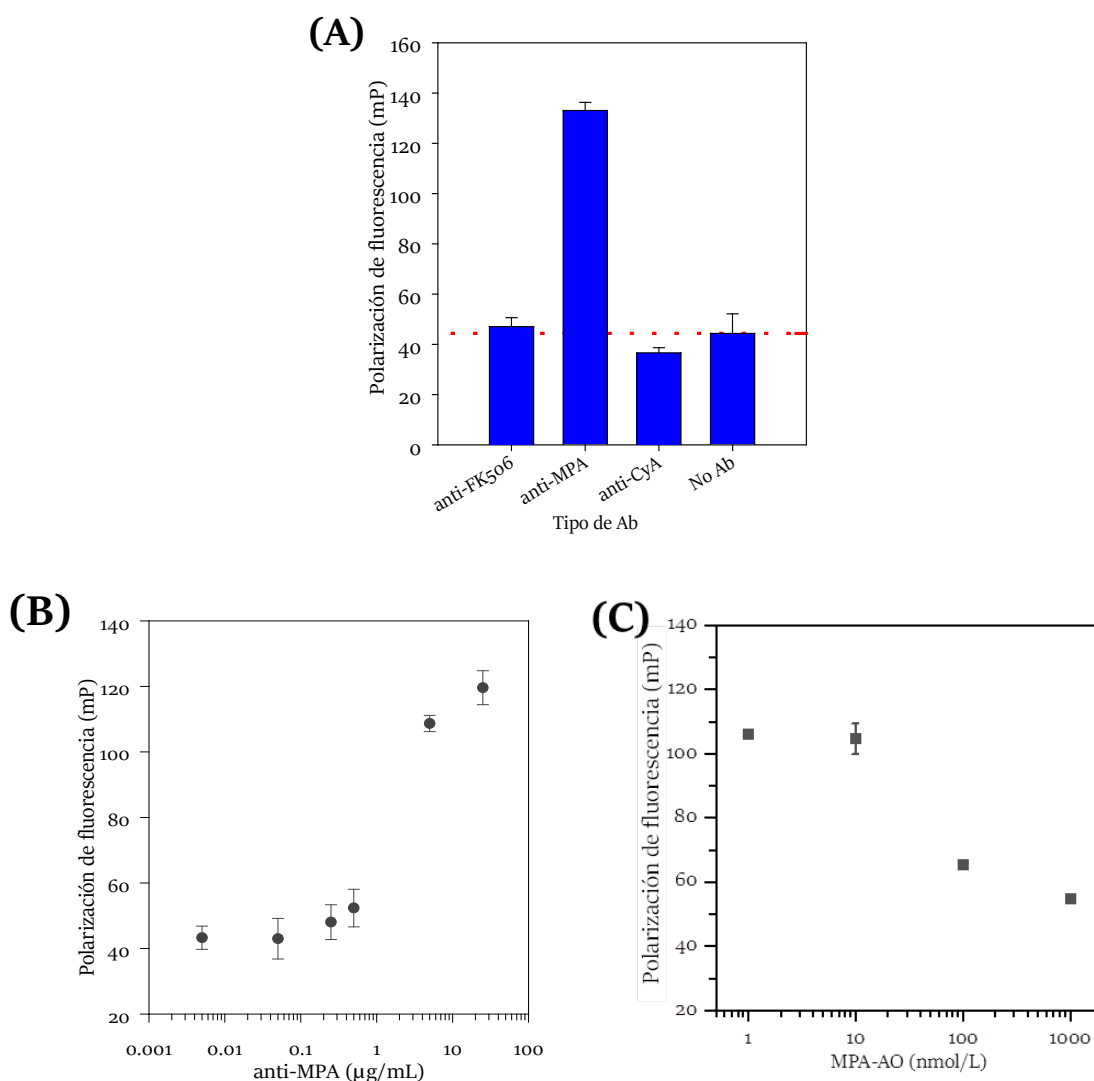


Figura 25. (A) Evaluación de la avidéz y especificidad de unión del conjugado fluorescente MPA-AO (1 nmol/L) frente a diferentes Abs (25 μg/mL) en PBST. La línea discontinua indica la señal media de polarización (n = 12) medida para el MPA-AO en ausencia de Ab. (B) Curva de dilución del Ab anti-MPA en presencia de 1 nmol/L de MPA-AO. (C) Curva de dilución de la molécula fluorescente MPA-AO en presencia de 5 μg/mL del Ab anti-MPA. Los resultados se muestran como la media de las señales ± el error estándar de la media (n = 3).

De forma análoga, se determinaron las concentraciones óptimas de MPA-LY para la interacción con el Ab anti-MPA, a diferentes concentraciones de Ab (0.25 – 5 μg/mL) y de marcador fluorescente (1 – 740 nmol/L) (**Figura 26**). En este caso los mejores resultados de sensibilidad y reproducibilidad se obtuvieron empleando concentraciones de MPA-LY de 7.4 nmol/L y 2 μg/mL de anti-MPA, que se seleccionaron para estudios posteriores.

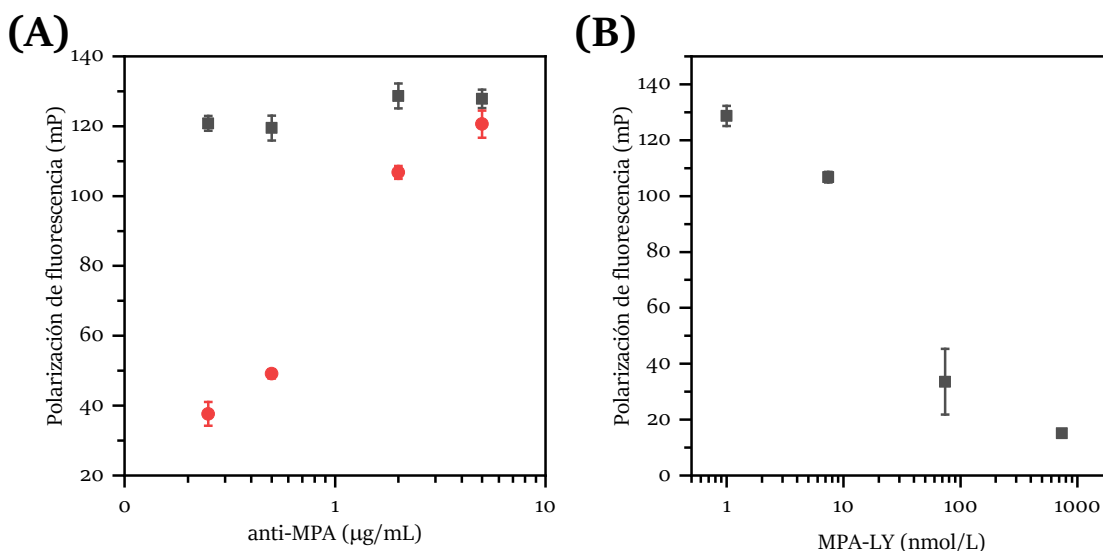


Figura 26. (A) Curva de dilución del Ab anti-MPA en presencia de una concentración constante de MPA-LY (■: 1 nmol/L y ●: 7.4 nmol/L). (B) Curva de dilución de la molécula fluorescente MPA-LY en presencia de 2 µg/mL del Ab anti-MPA. Los resultados se muestran como la media de las señales ± el error estándar de la media (n = 3).

4.4. Efecto de la composición de la disolución amortiguadora

La disolución reguladora ejerce un efecto notable en la reacción inmunoquímica.¹³⁴ Con el fin de seleccionar la disolución reguladora, así como su concentración y pH óptimos para el adecuado funcionamiento del inmunoensayo, se llevaron a cabo ensayos de polarización empleando diferentes disoluciones reguladoras, concretamente: tampón PBS (10 mmol/L, pH 7.4) con Tween 20 (0.05%) (PBST); Pierce[®] Protein Free (PBS) Blocking buffer (PFBB), tampón carbonato (10 mmol/L, pH 9.0) con Tween 20 (0.05%) (BCT); tampón MES (10 mmol/L, pH 5.7) con Tween 20 (0.05%) (MEST). Se llevaron a cabo ensayos competitivos en las distintas disoluciones reguladoras empleando 5 µg/mL de anti-MPA, 1 nmol/L de MPA-AO y diferentes concentraciones de MPA. En la **Figura 27** se muestran las curvas de competición obtenidas en cada caso. Se comprueba que el medio PBST proporciona las mejores prestaciones analíticas en términos de sensibilidad (IC₅₀ y LOD), reproducibilidad e intervalo dinámico (3 – 36 ng/mL).

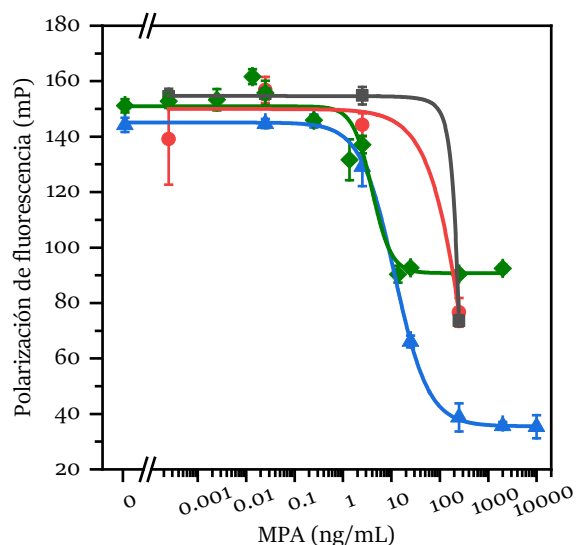


Figura 27. Curvas de calibrado correspondientes al inmunoensayo competitivo empleando el antígeno fluorescente MPA-AO y diferentes composiciones de disolución amortiguadora: PBST (\blacktriangle , $n = 3$); PFBB (\blacksquare , $n = 3$); BCT (\bullet , $n = 3$) y, MEST (\blacklozenge , $n = 3$). $[Ab \text{ anti-MPA}] = 5 \mu\text{g/mL}$, $[MPA\text{-AO}] = 1 \text{ nmol/L}$. Los resultados se muestran como la media de las señales el error estándar de la media ($n = 3$).

El mismo ensayo se repitió en presencia de disoluciones patrón de MPA en PBST en el intervalo de 0 - 10 $\mu\text{g/mL}$ y usando MPA-LY como antígeno marcado. Como se puede comprobar en la **Figura 28**, en este caso las mayores sensibilidades se obtienen tanto con PFBB como con PBST, aunque el intervalo dinámico de respuesta es ligeramente mayor cuando se utiliza PFBB (7 - 42 ng/mL vs 1.4 - 7 ng/mL), el límite de detección es menor con el PBST (1 ng/mL vs 4 ng/mL). Sin embargo, en comparación con los resultados obtenidos con el MPA-AO, la señal del fondo obtenida es más elevada cuando se utiliza MPA-LY, y el intervalo dinámico es más estrecho (1.4 - 7 ng/mL), por lo que se decidió descartar el empleo de este conjugado fluorescente para estudios posteriores.

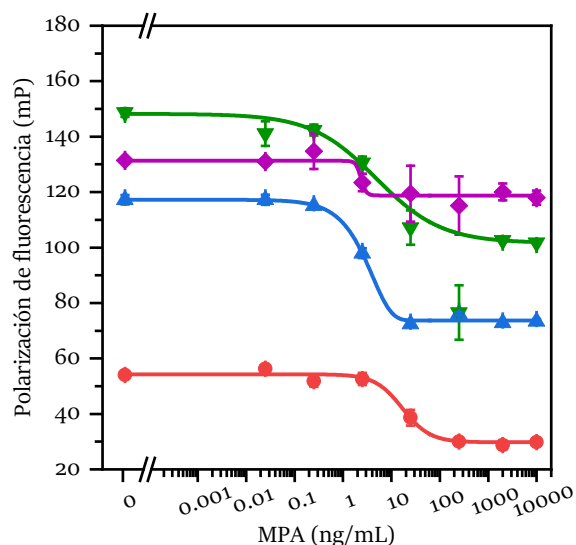


Figura 28. Curvas de calibrado correspondientes al inmunoensayo competitivo empleando el antígeno fluorescente MPA-LY y diferentes composiciones de disolución amortiguadora: PBST (\blacktriangle , $n = 3$); PFBB (\bullet , $n = 3$); CBT (\blacklozenge , $n = 3$), MEST (\blacktriangledown , $n = 3$). $[Ab \text{ anti-MPA}] = 2 \mu\text{g/mL}$, $[MPA-LY] = 7.4 \text{ nmol/L}$. Los resultados se muestran como la media de las señales el error estándar de la media ($n = 3$).

4.5. Optimización del tiempo de incubación

El tiempo de incubación tiene, generalmente, un efecto directo en las características analíticas del inmunoensayo, aunque en FPIA la interacción entre el Ab y el antígeno no está limitada por la difusión, como en el caso de los inmunoensayos heterogéneos. Es por ello, que cuando se emplea esta técnica las cinéticas de interacción Ab-Ag pueden ser relativamente rápidas aunque han de ser optimizadas.³⁴⁴

Se han ensayado tiempos de incubación comprendidos entre 0 y 80 min. Para ello, se llevaron a cabo ensayos competitivos empleando $5 \mu\text{g/mL}$ de Ab anti-MPA, 1 nmol/L de MPA-AO y diferentes concentraciones de MPA, comprendidas entre 0 y $10 \mu\text{g/mL}$. Como se observa en la **Figura 29**, a partir de 10 min de incubación se alcanza el equilibrio; sin embargo, la sensibilidad del ensayo (medida por su IC_{50}) y la reproducibilidad de la señal mejoraban significativamente a los 20 min, de modo que se seleccionó este tiempo para ensayos posteriores.

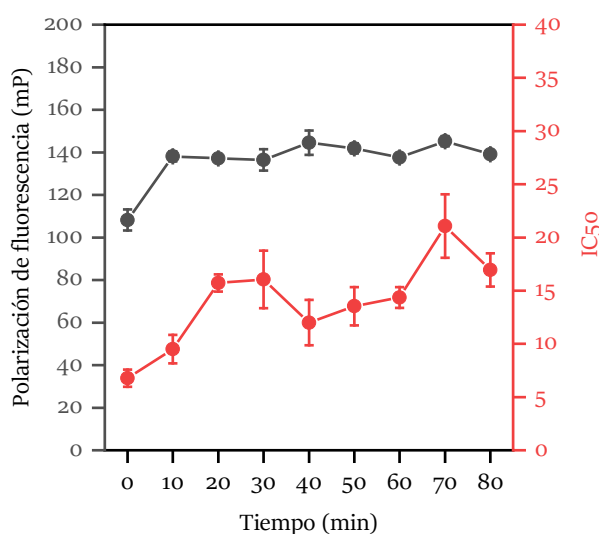


Figura 29. Cinética de la interacción entre el MPA-AO/MPA y el Ab medida empleando FPIA. (●) Polarización de fluorescencia obtenida en ausencia de MPA y 1 nmol/L de MPA-AO; (●) Valores de IC₅₀ de las curvas de calibrado obtenidas a diferentes tiempos de incubación. [Ab anti-MPA] = 5 µg/mL, [MPA-AO] = 1 nmol/L, [MPA] = 0 - 10 µg/mL en PBST. Los resultados se muestran como la media de las señales ± el error estándar de la media (n = 3).

4.6. Pretratamiento de los pocillos con una solución de bloqueo

Con el fin de minimizar las posibles uniones inespecíficas de los reactivos del ensayo sobre la superficie de los pocillos, éstos se trataron previamente con un tampón de bloqueo comercial libre de proteínas (Pierce[®] Protein-Free (PBS) blocking buffer). Como se muestra en la **Figura 30**, en comparación con el calibrado realizado sin bloquear los pocillos, este tratamiento permite aumentar la sensibilidad del ensayo disminuyendo el valor de IC₅₀ de 10.6 ng/mL a 5.8 ng/mL, e incrementar tanto el intervalo dinámico de respuesta como la reproducibilidad de las medidas. A la vista de estos resultados, todos los ensayos se llevaron a cabo bloqueando previamente los pocillos con 300 µL de PFBB durante 1 h.

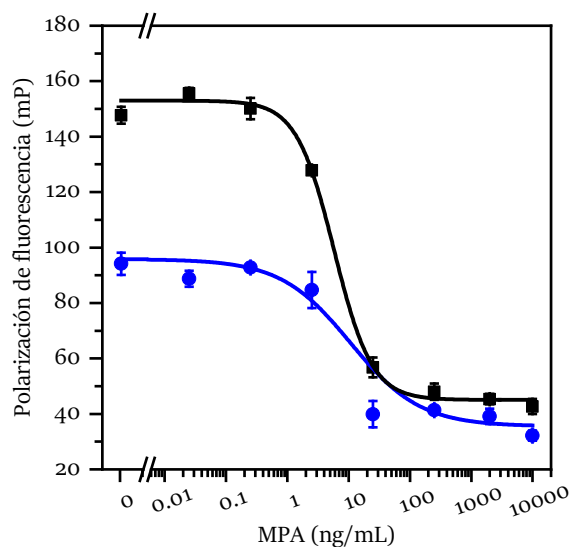


Figura 30. Comparación de las curvas de calibrado obtenidas para MPA bloqueando (■, $n = 3$, 8 puntos) y sin bloquear (●, $n = 3$, 8 puntos) los pocillos de la placa con el tampón de bloqueo comercial libre de proteínas Pierce® durante 1 h. [Ab anti-MPA] = 5 $\mu\text{g/mL}$; [MPA-AO] = 1 nmol/L, [MPA] = 0 - 10 $\mu\text{g/mL}$ en PBST. Los resultados se muestran como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

4.7. Caracterización analítica

Empleando las condiciones de medida optimizadas, se procedió a la caracterización analítica del inmunoensayo de polarización de fluorescencia para la determinación de MPA. En la **Figura 31** se muestran las curvas de calibrado obtenidas empleando patrones del inmunosupresor en PBST en el intervalo de 0.025 a 10 $\mu\text{g/mL}$ y MPA-AO como antígeno fluorescente.

El LOD, considerado como la concentración de analito que origina una disminución de la señal del 10% frente al blanco, es de 0.8 ng/mL. El valor IC_{50} del inmunoensayo corresponde a una concentración de MPA de inferior a 8 ng/mL. El DR, calculado como el intervalo de inhibición entre el 20% y el 80%, se situó entre 1.7 ± 0.2 y 39 ± 4 ng/mL de MPA.

La precisión del inmunoensayo se estimó en términos de la repetibilidad y la reproducibilidad de los calibrados obtenidos para MPA en el intervalo de concentraciones de 0.025 ng/mL a 10 $\mu\text{g/mL}$. Para evaluar la repetibilidad del inmunosensor se llevaron a cabo ensayos independientes, a 3 niveles de concentración de MPA (2.5, 5 y 25 ng/mL) utilizando el mismo método de medida e idénticas variables experimentales, en el mismo laboratorio y con el mismo operador en cortos intervalos de tiempo.³⁴⁵

En la **Tabla 10** se muestran los valores obtenidos de recuperación y de RSD obtenidos para las diferentes concentraciones de MPA ensayadas. Estos valores de RSD son aceptables para inmunoensayos (entre 1% y 15%).

Tabla 10. Estudio de la repetibilidad del inmunoensayo.

MPA añadido (ng/mL)	n	Concentración medida (ng/mL)	RSD (%)	Recuperación (%)
2.5	9	2.5 ± 0.1	8	100
5	6	4.9 ± 0.2	6	98
25	9	24 ± 2	10	96

Para evaluar la reproducibilidad de la medida se realizaron 3 calibrados, en días alternos en el intervalo de concentración 0.025 ng/mL a 10 µg/mL de MPA. A partir de los mismos se calculó un valor medio de IC₅₀ de 7.7 ng/mL con una RSD = 6%. Todos los niveles ensayados mostraron una RSD inferior al 16%. Estos resultados se pueden considerar satisfactorios para métodos de análisis de residuos mediante técnicas inmunológicas.³⁴⁶

Comparado con otros inmunoensayos y kits comerciales usados para la cuantificación de MPA,^{241,252,266,347} el inmunoensayo de polarización de fluorescencia desarrollado para el análisis de inmunosupresor libre presenta tanto mayor sensibilidad como reproducibilidad que aquellos descritos hasta ese momento. Posteriormente, nuestro grupo de investigación ha descrito un ensayo bioluminiscente que permite mejorar la sensibilidad.¹³⁷

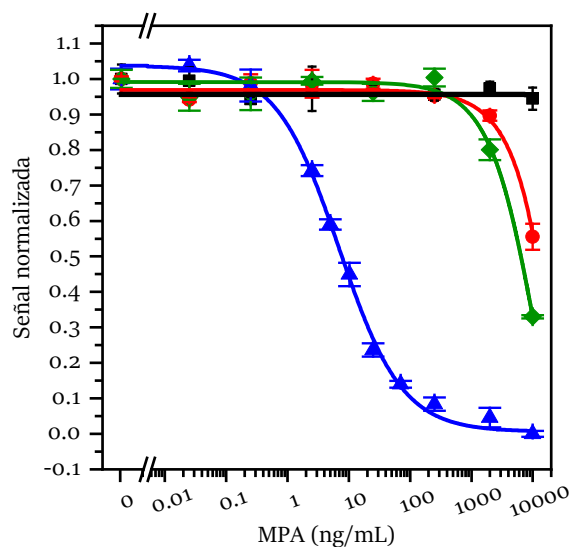


Figura 31. Curva de calibrado correspondiente al inmunoensayo competitivo de FP para el MPA (▲, $n = 9$, 11 puntos), MPAG (◆, $n = 3$, 8 puntos), tacrolimus (■, $n = 3$, 8 puntos) y ciclosporina A (●, $n = 3$, 8 puntos) en PBST. [Ab anti-MPA] = 5 $\mu\text{g/mL}$; [MPA-AO] = 1 nmol/L, [ISDs] = 0 - 10 $\mu\text{g/mL}$ en PBST. Los resultados se muestran como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

La reactividad cruzada (CR) del inmunoensayo se determinó comparando la curva de calibrado obtenida para el MPA con las correspondientes a los compuestos considerados como interferentes (Apartado 3.5). En esta Tesis Doctoral se ha evaluado la CR frente a dos inmunosupresores, la CsA y el FK506, coadministrados habitualmente junto con el MPA en pacientes trasplantados de órgano sólido.³⁰ Además, se determinó la CR frente al β -D-glucurónido del ácido micofenólico (MPAG), que se forma al metabolizarse el MPA mediante las enzimas glucuronil transferasas a nivel hepático e intestinal.³⁴⁸

Como se observa en la **Figura 31**, no hay reactividad cruzada ($\text{CR} < 1\%$) para ninguno de los inmunosupresores ensayados, cuyas concentraciones terapéuticas en sangre se encuentran comprendida en el intervalo de 150 y 350 ng/mL para la CsA,³⁴⁹ y entre 5 y 20 ng/mL para el FK506.⁷¹ En el caso del MPAG, las concentraciones descritas en sangre aparecen en el intervalo de 35 - 100 $\mu\text{g/mL}$.³⁵⁰ Si bien estas concentraciones darían lugar a una elevada reactividad cruzada, hay que tener en cuenta que, al igual que el MPA, el MPAG se encuentra unido a las proteínas del suero y tan sólo un 18% en forma libre.³⁵¹ Además, las muestras analizadas son tratadas para eliminar el MPA y MPAG unido a proteína, y se diluyen 1/4 con buffer PBST, por lo que los niveles de MPAG

presentes producen una CR inferior al 10%. Estos resultados confirman la excelente especificidad de la FPIA.

4.8. Selección del tratamiento de muestra

Como se puede observar en la **Figura 32**, cuando las curvas de calibrado se realizaron en suero sanguíneo diluido en PBST, la señal de polarización obtenida se mantuvo constante y máxima para todos los niveles de concentración de MPA ensayados. Estos valores elevados de polarización pueden explicarse debido a la unión no específica del MPA-AO a la HSA presente en la muestra de suero sanguíneo (**Figura 22**).⁵³ Para evitar esta interferencia, las muestras se filtraron empleando dispositivos de ultrafiltración Amicon[®] (apartado 3.6) para obtener suero libre de proteínas.

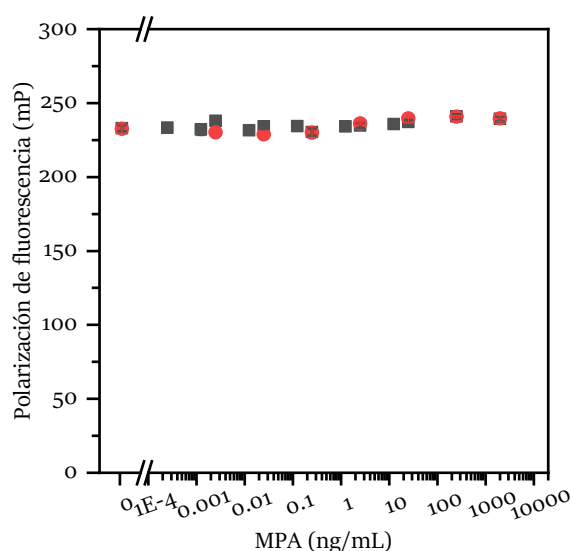


Figura 32. Curvas de calibrado obtenidas para el MPA en suero sanguíneo sin filtrar a una dilución 1/2 (v/v) (●, $n = 3$, 14 puntos) y 1/4 (v/v) (▲, $n = 3$, 8 puntos). [Ab anti-MPA] = 5 $\mu\text{g/mL}$; [MPA-AO] = 1 nmol/L, [MPA] = 0 - 10 $\mu\text{g/mL}$ en PBST. Los resultados se muestran como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

Inicialmente, para evaluar la retención inespecífica del analito en los dispositivos de ultracentrifugación Amicon[®], se determinó la recuperación obtenida al filtrar 0.5 mL de una disolución 20 ng/mL de MPA en PBST empleando la Ecuación 12, comprobándose que el fármaco se adsorbía en los filtros un 40% aproximadamente.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{[MPA]_{\text{ultrafiltrado}}}{[MPA]_{\text{total}}} * 100 \quad (12)$$

Se probaron diferentes tratamientos del sistema de filtración, previo al proceso de ultrafiltrado, para minimizar las pérdidas de MPA: a) bloqueo estático (30 min) o dinámico mediante centrifugación de las membranas con 500 μ L de tampón de bloqueo comercial libre de proteínas PFBB; b) doble preaclorado de las membranas con 500 μ L de PBST; c) doble preaclorado con 500 μ L de NaOH y 500 μ L de PBST. Los resultados obtenidos (**Figura 33**) demuestran que el empleo de una etapa previa de lavado con PBST minimiza las retenciones inespecíficas en el dispositivo de ultrafiltración obteniéndose recuperaciones de MPA del orden del 87% (RSD = 4%). En consecuencia, este tratamiento se empleó en todos los experimentos con las muestras biológicas.

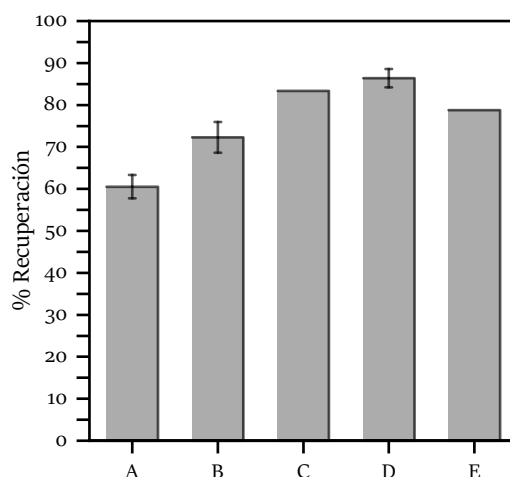


Figura 33. Selección del pretratamiento óptimo para los dispositivos de ultrafiltración Amicon[®]. A: sin tratamiento previo, B: bloqueo dinámico con PFBB, C: doble preaclorado con NaOH y PBST, D: Preaclorado con PBST, E: bloqueo en estático con PFBB. Los resultados se muestran como la media de las señales \pm el error estándar de la media (n = 3).

4.9. Efecto matriz en muestras biológicas

Las muestras biológicas son matrices complejas pueden afectar a los inmunoensayos, debido a la presencia de interferentes que pueden afectar a la interacción entre el antígeno y el Ab, o que favorezcan las interacciones no específicas del antígeno fluorescente.¹³⁴ Para evaluar la posible existencia de efecto matriz, muestras de suero comercial y de plasma de una voluntaria joven (no tratada con inmunosupresores) se ultrafiltraron para eliminar proteínas y se fortificaron con concentraciones crecientes de MPA (0 – 10 μ g/mL) antes de su análisis.

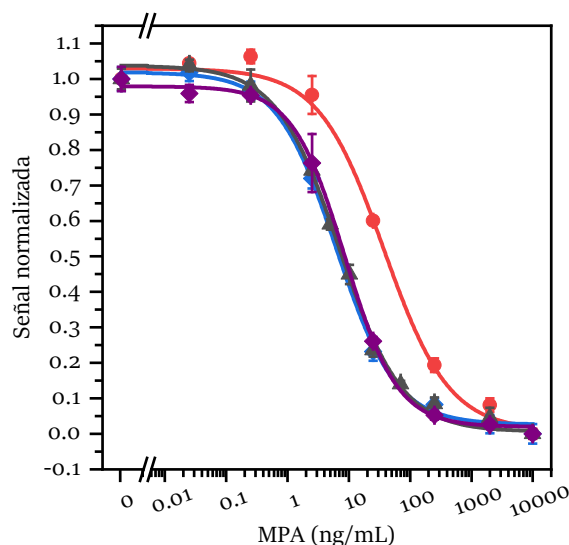


Figura 34. Comparación de las curvas de calibrado obtenidas usando MPA-AO en PBST (\blacktriangle , $n = 9$, 11 puntos), suero ultrafiltrado (\bullet , $n = 3$, 8 puntos), suero ultrafiltrado con una dilución 1/4 (v/v) en PBST (\blacklozenge , $n = 9$, 8 puntos) y plasma ultrafiltrado con una dilución 1/4 (v/v) en PBST (\blacksquare , $n = 3$, 8 puntos). [Ab anti-MPA] = 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; [MPA-AO] = 1 nmol/L . Los resultados se muestran como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

En la **Figura 34** se muestran las curvas de calibrado obtenidas en los inmunoensayos competitivos empleando MPA-AO como antígeno marcado en el extracto obtenido tras la ultrafiltración sin diluir, y con una dilución 1/4 (v/v) con PBST. No se observan diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el calibrado obtenido en PBST y los medidos en el extracto de suero o plasma diluidos (1/4, v/v), por lo que se decidió emplear estas condiciones para las medidas realizadas en muestras biológicas.

4.10. Estudios de recuperación en muestras salpicadas de suero y sangre

El inmunoensayo de polarización se aplicó al análisis de MPA libre en muestras de suero comercial fortificadas con el inmunosupresor a tres niveles de concentración (1000, 5000 y 10000 ng/mL). Las muestras se ultrafiltraron antes del análisis y los resultados se compararon con los obtenidos empleando RRLC-DAD. Como se muestra en la **Tabla 11**, no existen diferencias significativas entre los valores de MPA libre estimados por ambos métodos a ninguno de los niveles de concentración ensayados.

Los resultados sugieren que tras la añadir el MPA al suero, la mayor parte del inmunosupresor se une a las proteínas séricas, las cuales se eliminan en la etapa de ultrafiltración. La cantidad determinada de MPA libre se encontraba entre el 0.75 – 1.3%,

lo que está de acuerdo con los valores reportados en la literatura para este analito en muestras sanguíneas.^{46,51,52,233,352}

Tabla 11. Comparación los resultados obtenidos para la cuantificación del MPA en muestras de suero enriquecidas con MPA empleando el método FPIA optimizado y RRLC-DAD ($n = 3$).

Concentración nominal de MPA (ng/mL)	Concentración medida (ng/mL)		RSD (%)		Fracción libre (%)	
	FPIA	RRLC-DAD	FPIA	RRLC-DAD	FPIA	RRLC-DAD
1000	13	18	22	12	1.3	1.8
5000	41	43	5	6	0.83	0.86
10000	75	72	4	6	0.75	0.72

RSD: Desviación estándar relativa (del inglés *Relative standard deviation*)

4.11. Aplicación en el análisis de muestras de plasma reales

Por último, se evaluó la idoneidad del ensayo desarrollado para la cuantificación de MPA libre en una muestra de plasma de una voluntaria trasplantada (tratada con mofetil micofenolato y FK506). Después de un paso previo de ultrafiltración para eliminar las proteínas, la muestra se enriqueció con 36 y 72 ng/mL de MPA.

Como se muestra en la **Tabla 12**, la concentración de MPA libre de la muestra es de 19 ng/mL (RSD = 14%). Las recuperaciones obtenidas con el método optimizado se encuentran en el intervalo del 99 – 103% con desviaciones estándar relativas entre el 7 – 9%, demostrando la aplicabilidad del método FPIA para el análisis de MPA libre en muestras reales. Además, los resultados resultaron comparables estadísticamente a los obtenidos mediante RRLC-DAD ($P > 0.05$).

Tabla 12 Estudios de recuperación de MPA libre en muestras de suero de un voluntario trasplantado, empleando el método FPIA optimizado y RRLC-DAD ($n = 3$).

MPA añadido (ng/mL)	FPIA			RRLC-DAD		
	Concentración medida (ng/mL)	RSD (%)	Recuperación (%)	Concentración medida (ng/mL)	RSD (%)	Recuperación (%)
0	19	14	-	19	4	-
36	57	7	103	54	4	99
72	90	9	99	90	2	96

RSD: Desviación estándar relativa (del inglés *Relative standard deviation*)

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la idoneidad de los marcadores fluorescentes, con emisión en el infrarrojo cercano, para el desarrollo de métodos de detección basados en FPIA y, más concretamente, para el análisis del inmunosupresor MPA en muestras biológicas de manera rápida y sensible.

De los distintos conjugados fluorescentes ensayados el derivado del Azul Nilo es el que ha permitido obtener resultados más sensibles para la determinación de MPA. Sin embargo, no ha sido posible aplicar el ensayo al análisis de FK-506 o CsA, ya que no se obtienen las sensibilidades requeridas para estos análisis.

El método FPIA optimizado, permite la cuantificación de la fracción libre de MPA en muestras de suero o plasma con una mejora significativa de los LODs, en comparación con los inmunoensayos descritos en la bibliografía para este tipo de análisis. Asimismo, también proporciona mejores resultados en términos de reproducibilidad y selectividad que dichos ensayos.

Para llevar a cabo el ensayo en muestras reales es necesaria la ultrafiltración de las mismas a fin de aislar la fracción de MPA libre, que es la forma farmacológicamente activa, de las muestras de suero o plasma analizadas. Esto es debido a que en presencia de HSA el antígeno marcado se une a la proteína y la señal de FP no se modifica al aumentar la concentración de MPA en la muestra.

El inmunoensayo se ha aplicado de forma satisfactoria en el análisis de MPA libre en la sangre de un paciente trasplantado de corazón, validándose los resultados mediante RRLC-DAD. No se ha observado efecto de matriz cuando las muestras de suero o plasma ultrafiltradas se diluyen (1/4, v/v) en PBST, siendo posible el análisis simultáneo de 96 muestras en tan solo 20 min empleando un lector de microplacas CLARIOstar.

Los resultados del análisis del MPA libre confirman la baja concentración del analito libre, que es la forma farmacológicamente activa, en las muestras de suero o plasma. El inmunoensayo de polarización de fluorescencia que aquí se presenta es muy prometedor para su aplicación en dispositivos de diagnóstico POC.

**VII. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES
FLUORESCENTES PARA LA
DETECCIÓN DE FK₅₀₆**

1. Introducción

Como se ha comentado anteriormente, los Abs interactúan con su Ag correspondiente con gran especificidad y afinidad, siendo una herramienta indispensable tanto en aplicaciones bioanalíticas como en terapias médicas.

Muchos de los Abs disponibles para la realización de inmunoensayos provienen de animales a los cuales se les ha administrado cantidades crecientes del analito de interés (o un conjugado inmunogénico del mismo) originando la respuesta inmune celular y humoral. En este último caso, los Abs producidos se recolectan del suero sanguíneo obteniéndose mezclas de Abs policlonales,³⁵³ cuya proporción y tipo depende del animal, y donde la irreproducibilidad entre lotes es frecuente.³⁵⁴ Algunas limitaciones de esta estrategia incluyen, la dificultad de producir Abs frente a sustancias tóxicas, o cuando el analito no desencadena la respuesta inmune.

A parte de las limitaciones descritas anteriormente, también hay que tener en cuenta los problemas éticos derivados del empleo de animales de experimentación para la obtención de Abs.³⁵⁵ De acuerdo a las recientes recomendaciones de las autoridades europeas para la protección de los animales usados con fines científicos, los animales no deberían utilizarse para el desarrollo y la producción de anticuerpos.³⁵⁵⁻³⁵⁷ Una alternativa, al empleo de anticuerpos derivados de animales para el desarrollo de bioensayos, es el uso de tecnologías que faciliten la obtención de receptores biomiméticos de gran afinidad.^{358,359}

En general, los receptores biomiméticos suelen ser aptámeros, producidos empleando la técnica SELEX, y proteínas recombinantes o fragmentos de anticuerpos, producidos empleando la tecnología de presentación sobre fagos o *phage display*. En todos los casos, los receptores seleccionados mediante ambas tecnologías, presentan una buena especificidad y afinidad por el analito, una alta reproducibilidad entre lotes y un suministro ilimitado a gran escala, a relativamente bajo coste.

En el caso de los ISDs existen ejemplos en los que se utilizan receptores biomiméticos como alternativa a los Abs para la realización del bioensayo. Por ejemplo, se ha descrito el empleo de aptámeros para la determinación de FK506,²⁷⁸ proteínas

recombinantes para detectar CsA y FK506,²⁷⁷ y fragmentos de anticuerpo para el análisis de MPA.¹³⁵

1.1. Proteínas de unión al FK506

Las proteínas de unión al FK506 (FKBP) son una extensa familia de proteínas, que presentan dominios peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIase) y forman parte de las inmunofilinas. Se encuentran en gran número de organismos, aunque difieren en número, por ejemplo en humanos se han documentado 18 tipos, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tan solo existen 4 en tanto que, en la planta del arroz (*Oryza sativa*) se han hallado 29 tipos FKBP.³⁶⁰ Su función en el organismo incluye el plegamiento de proteínas, señalización de receptores, la transcripción génica, el tráfico intracelular de proteínas, la apoptosis y la regulación del ciclo celular.³⁶¹

La FKBP12 o FKBP1A es una proteína globular citosólica, se trata del miembro más pequeño de la familia con un tamaño de 12 kDa y presenta un único dominio PPIase. Esta proteína forma complejos con los ISDs FK506 y Sir, uniéndose con alta afinidad y mediando en su efecto inmunosupresor.³⁶² Sin embargo, cada uno de estos complejos tiene efectos diferentes en el sistema inmune; por ejemplo, el complejo FK506-FKBP1A (**Figura 35**) inhibe la calcineurina mientras que, el complejo Sir-FKBP1A inhibe la señal mTOR,³⁶³ con efectos ya descritos en el Capítulo IV.

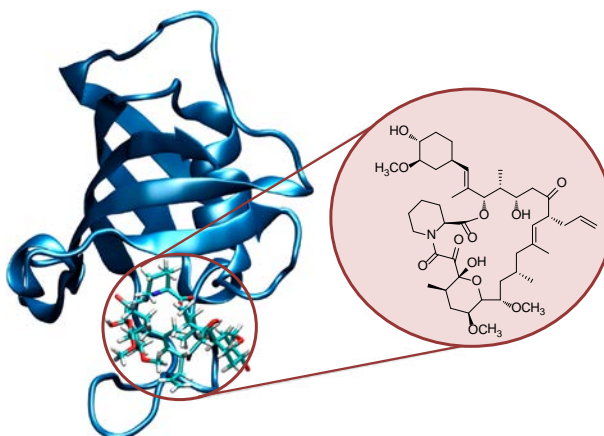


Figura 35. Estructura tridimensional del complejo FKBP12-FK506 y estructura del FK506. Reproducción con permiso de referencia.³⁶⁴

Existen en la literatura numerosos ejemplos del empleo de estas proteínas, bien en forma nativa o modificadas genéticamente con proteínas fluorescentes, para estudiar interacciones proteína-proteína o para marcaje celular;³⁶⁵⁻³⁷¹ así como para el estudio de nuevos ligandos sustitutivos del FK506.³⁷²⁻³⁷⁶ Aunque la FKBP1A se ha empleado en algunas plataformas sensoras,^{253,275-277,377} su aplicación fusionada a proteínas fluorescentes para el desarrollo de bioensayos para la detección de FK506, o Sir, en sangre como alternativa a los anticuerpos no se ha descrito hasta la fecha.

1.2. Marcaje de proteínas mediante sustancias luminiscentes

Las técnicas luminiscentes, como la fluorescencia o la quimioluminiscencia, son herramientas bien establecidas en la interfaz de la Química, la Física y la Biología que han permitido la implementación de técnicas analíticas muy sensibles. En la actualidad, se utilizan de manera habitual para el desarrollo de sensores y biosensores ópticos, así como para el estudio de las interacciones receptor-ligando.

Los ensayos basados en fluorescencia presentan alta sensibilidad y robustez, precisan de volúmenes pequeños de muestra y requieren del empleo de una baja concentración de material fluorescente. El marcaje de proteínas permite observar procesos biológicos *in vivo*, como interacciones proteicas, su localización o el estudio de cambios conformacionales.³⁷⁸ Por otro lado, también se pueden realizar ensayos a nivel extracelular para detectar y cuantificar las moléculas de interés.³⁷⁹

Las proteínas presentan fluorescencia intrínseca, asociada a la presencia de residuos aromáticos en su estructura, que se ha empleado para evaluar eventos de unión.³⁷⁴ No obstante, el empleo de etiquetas fluorescentes extrínsecas presenta una serie de ventajas que incluyen, una mayor sensibilidad y selectividad, así como el aprovechamiento del carácter “multidimensional” de la fluorescencia que permite emplear por ejemplo, la medida del tiempo de vida de emisión o la polarización de fluorescencia para el desarrollo de métodos analíticos. El marcaje con la sonda seleccionada debe de cumplir una serie de requisitos que garanticen una perturbación mínima del plegamiento y la actividad de la proteína. En este sentido, las etiquetas fluorescentes deben ser pequeñas, específicas, estables, brillantes, sin tendencia a la

oligomerización y que, preferentemente, formen un enlace covalente con la proteína de interés.³⁸⁰

En la literatura existen numerosos métodos de marcaje de proteínas. A continuación, se describen algunos de los más empleados.

1.2.1. Marcaje químico de proteínas empleando sondas fluorescentes

En general, las sondas fluorescentes o fluoróforos orgánicos se caracterizan por su pequeño tamaño, fotoestabilidad, amplia gama espectral y, en muchos casos, por una excelente luminosidad.³⁸¹ Sin embargo, emplear estos compuestos para realizar el marcaje fluorescente de proteínas implica una serie de dificultades como son, el control de la especificidad y estequiometría de la reacción de funcionalización o la eliminación eficaz de la etiqueta fluorescente excedente, que puede dar lugar a una señal de fondo elevada.

Las modificaciones específicas de las proteínas empleando moléculas pequeñas se realiza en las cadenas laterales de los aminoácidos que forman la cadena peptídica. Por ello, las reacciones químicas para el marcaje vendrán determinadas por el número de grupos funcionales reactivos presentes en la proteína (**Figura 36**), o por la presencia de aminoácidos no naturales que presenten funcionalidad biortogonal.

La incorporación de sondas mediante la modificación del residuo -SH del aminoácido cisteína, es un método ampliamente utilizado para la modificación de proteínas. Por una parte, su abundancia es relativamente baja,³⁸² lo que facilita la incorporación del fluoróforo en un lugar específico y, por otra, el carácter nucleófilo del grupo tiol es mayor que el de otros grupos funcionales de las cadenas laterales de aminoácidos. La modificación más empleada es mediante una alquilación con maleimidias o con α -halocarbonilos.^{383,384} Alternativamente, una forma de emplear esta química en proteínas que no posean cisteínas en la superficie es llevar a cabo una mutagénesis sitio-dirigida, aunque solo debe hacerse en aquellos casos en los que se disponga de suficiente información estructural sobre las proteínas para no modificar zonas que afecten a su función. Por otro lado, si existen demasiados grupos disponibles y se quiere hacer un

marcaje selectivo se puede llevar a cabo la protección reversible de algunos de ellos empleando iones metálicos.³⁸⁵

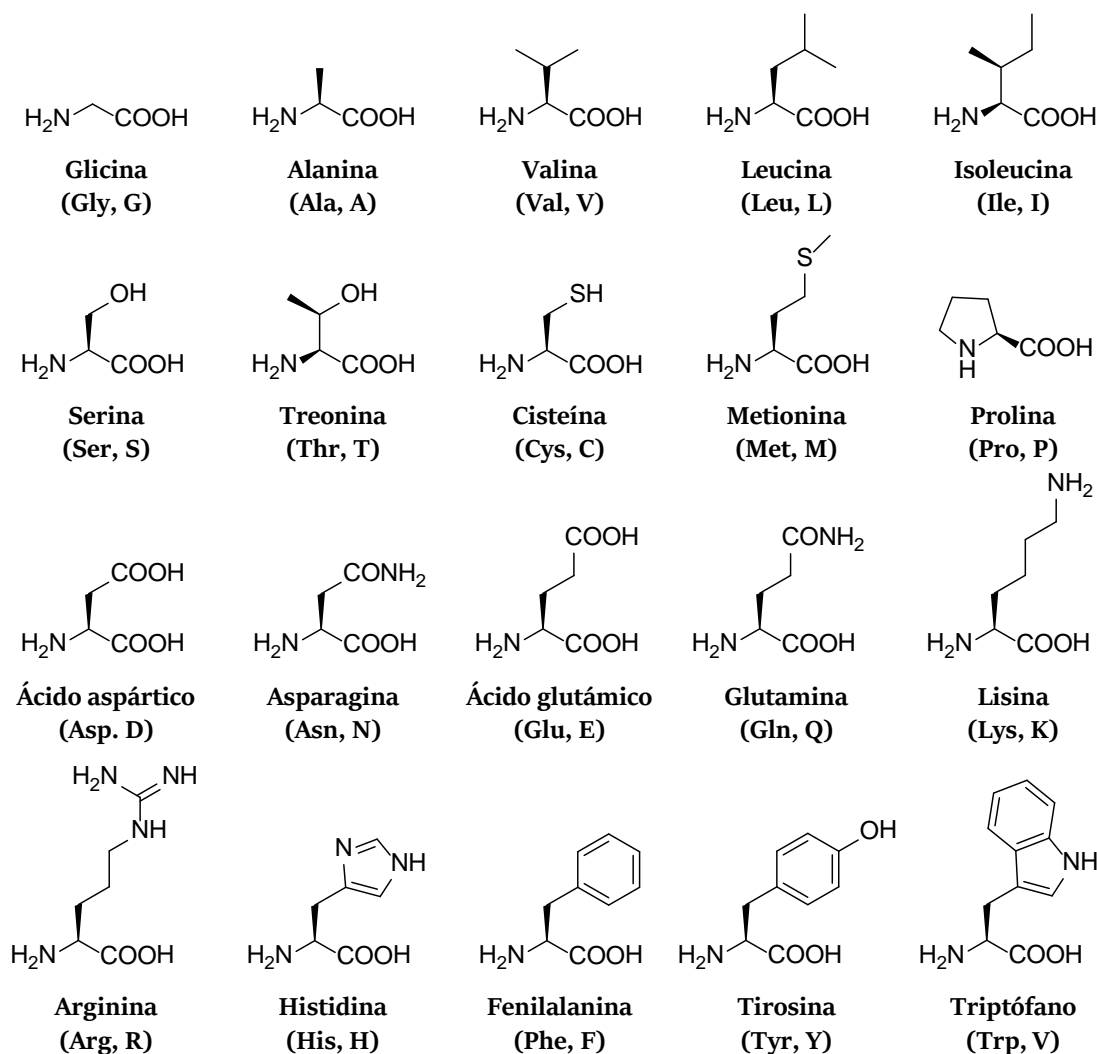


Figura 36. Estructura química de los aminoácidos naturales.

El método más común para la conjugación de proteínas es la modificación de las lisinas, dada su abundancia en las proteínas. Las reacciones de marcaje de aminas se realizan de manera eficiente mediante rutas de acilación o alquilación³⁸⁶ empleando esteres activados, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Generalmente se requieren condiciones de pH básicas, debido al elevado pK_a del grupo amino. Estas reacciones también pueden emplearse para modificar el grupo N-terminal de la proteína, que debido a que presenta un pK inferior al de los grupos amino de las lisinas, puede derivatizarse de manera específica, aunque limitada.³⁸⁷ Una alternativa que permite

controlar la reacción y modificar una única lisina, es el empleo de sulfonilacrilatos seguido de una adición aza-Michael. En este caso, se modifica la lisina más reactiva de la proteína, que se puede predecir *in silico*.³⁸⁸

La metionina es el segundo aminoácido menos abundante y, debido a su hidrofobicidad, rara vez se encuentra en la superficie expuesta al disolvente, lo que dificulta su modificación. No obstante, se han descrito métodos de marcaje basados en el uso de derivados de la oxaziridina para el marcaje de metionina que permiten su posterior bioconjugación de forma quimioselectiva.³⁸⁹

Otra forma de modificar proteínas de manera específica son las reacciones impulsadas por el reconocimiento.³⁹⁰ Un ejemplo es la química del tosilo dirigida por ligando,^{391,392} que permite la modificación de residuos de histidina, tirosina, ácido glutámico, ácido aspártico y cisteína cercanos al sitio de unión del ligando. La variante con acil imidazol permite modificar las cadenas laterales de lisinas y serinas.³⁹³

1.2.2. Marcaje de proteínas mediante modificación genética

El descubrimiento y la incorporación generalizada de la proteína verde fluorescente (GFP) y moléculas homólogas es un ejemplo claro de esta estrategia de modificación de proteínas (apartado 1.3). Este tipo de etiquetado, de alta compatibilidad biológica,³⁹⁴ permite la fusión de la proteína de interés con una proteína fluorescente en el extremo N o C terminal con una estequiometría fija.³⁹⁴⁻³⁹⁶ Sin embargo, una desventaja significativa de este marcaje es que la conformación de la proteína puede verse alterada por la incorporación de etiquetas proteicas de gran tamaño (>25 kDa), alterando su función.³⁹⁷

Para evitar esta dificultad, una alternativa es la incorporación de pequeñas colas peptídicas, dominios proteicos o aminoácidos individuales en la proteína de interés que permitan el marcaje posterior con fluoróforos orgánicos o con proteínas fluorescentes.^{398,399} Por ejemplo, las colas de histidinas (HisTag) se han aplicado para marcar fluorescentemente proteínas con fluoresceína, Cy5 y Oregon Green 488, entre otros.⁴⁰⁰ En una aproximación equivalente, también se ha utilizado para el marcaje el péptido FLAG (-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-).^{401,402}

Las etiquetas de tetracisteína están compuestas por una pequeña cadena peptídica que contiene cuatro cisteínas en la secuencia, -Cys-Cys-X-X-Cys-Cys-, siendo X cualquier aminoácido excepto la cisteína, normalmente -Pro-Gly-.⁴⁰³ Este péptido se une a moléculas biarsenicales, como la 4',5'-bis(1,3,2-ditioarsolan-2-il)fluoresceína denominada FlAsH,⁴⁰⁴ donde los dos sustituyentes As (III) se emparejan con los cuatro grupos tiol de las cisteínas.⁴⁰⁵ Un problema asociado al uso de estos marcadores es la señal de fondo, debida a la interacción que se produce con otras cisteínas presentes en la proteína de interés, o en otras proteínas presentes en la muestra.

El enlace isopeptídico se forma por la condensación de un grupo amino con un grupo carboxílico, o una amida primaria localizados en las cadenas laterales de los aminoácidos. Estos enlaces se forman de manera natural tanto en eucariotas como en bacterias. Basados en proteínas extracelulares de bacterias Gram-positivas (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*) se emplean los sistemas SpyCatcher-SpyTag, SnoopCatcher-SnoopTag y sus derivados.⁴⁰⁶ En estos sistemas, el evento de unión tiene lugar entre la lisina y el ácido aspártico, o la asparagina, presentes en las secuencias de un péptido *Tag* (13 aminoácidos) y una pequeña proteína específica *Catcher* (~15.6 kDa);⁴⁰⁶ formándose un enlace covalente irreversible de manera rápida y robusta, en un amplio rango de temperatura, pH y fuerza iónica.⁴⁰⁷ Estos sistemas se han empleado para el marcaje de proteínas con diferentes proteínas fluorescentes, combinando ambos sistemas de manera ortogonal.⁴⁰⁸

Alternativamente, el sistema SNAP-tag (~20 kDa), obtenido a partir de la mutación de la proteína de reparación del ADN O⁶-alquilguanina-DNA alquiltransferasa, reacciona de forma rápida y específica con derivados de la O⁶-benzilguanina.⁴⁰⁹ La unión de este derivado se produce en el grupo tiol del residuo de cisteína del SNAP-tag, permitiendo la unión covalente de un marcador sintético a la proteína.^{409,410} Esta aproximación permite la unión con una amplia variedad de sondas sintéticas.⁴¹¹⁻⁴¹³ A partir del SNAP-tag se creó el CLIP-tag (~20 kDa), que reacciona de manera específica con derivados de la benzilcitosina y, de manera ortogonal, al SNAP-tag.⁴¹⁴

El sistema HaloTag está formado por una proteína (33 kDa) modificada a partir de la enzima haloalcano deshalogenasa, que ha sido diseñada para unirse de manera

covalente a ligandos sintéticos que contienen un cloroalcano.^{415,416} La versatilidad que presenta este sistema le convierte en procedimiento de marcaje óptimo para aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*.⁴¹⁶

Finalmente, el empleo de aminoácidos no naturales es una técnica versátil que permite la incorporación de grupos funcionales, o fluoróforos, en sitios específicos de la proteína.⁴¹⁷ Se puede incorporar una amplia gama de aminoácidos no naturales usando cuatro pares de bases codon-anticodon.⁴¹⁸ Un ejemplo sería introducir en el gen que codifica la proteína un codón de parada ambar (UAG). Al producirse la traducción, un tARN que lleva el anticodón AUC (aminoacilado con un ácido no natural), suprime el codón de parada y permite la producción de la proteína completa conteniendo el aminoácido no natural. Mediante este proceso, se han marcado fluorescentemente posiciones específicas de receptores, anticuerpos y enzimas.⁴¹⁹⁻⁴²¹

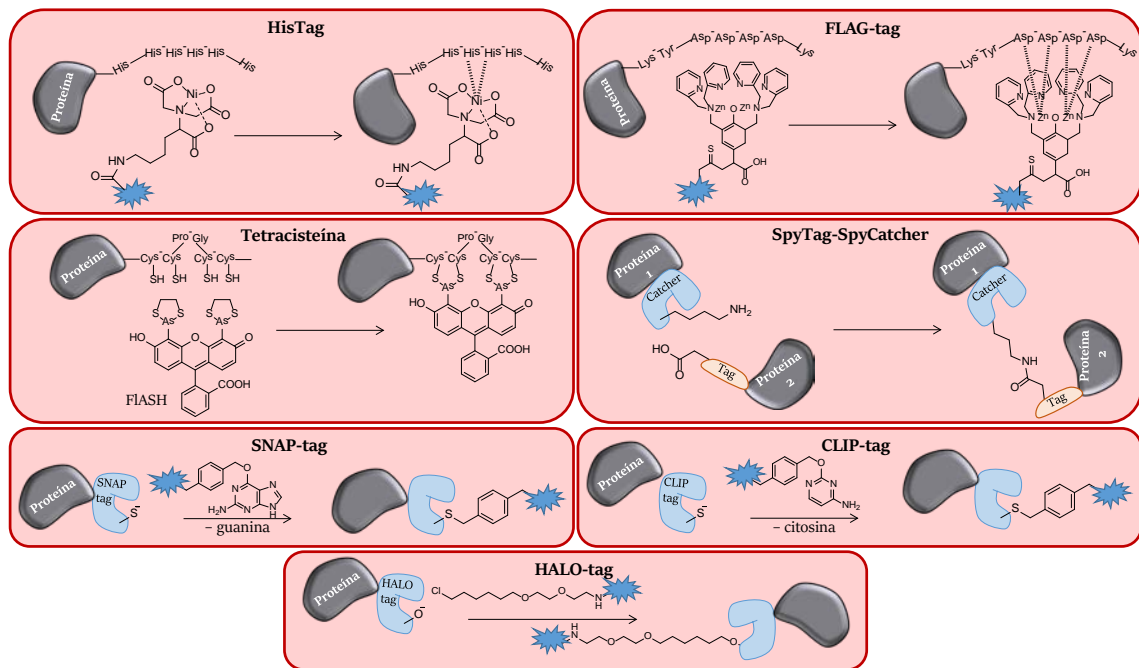


Figura 37. Esquema del marcaje de proteínas con diferentes etiquetas.

1.2.3. Marcaje enzimático de proteínas

Las reacciones empleadas para el marcaje de proteínas con enzimas son rápidas, selectivas y eficientes, pudiendo realizarse *in vitro* e *in vivo*. Este tipo de marcaje se puede clasificar en dos grupos: en el primero, la enzima actúa únicamente como catalizador (ej.

transglutaminasa, sortasa),^{422,423} mientras que en el segundo la enzima sufre una modificación previa al marcaje con la etiqueta (ej. cutinasa inteína, haloalcano dehalogenasa).^{399,424} Este segundo grupo muestra una gran eficiencia y especificidad, ya que la unión de la sonda a la etiqueta peptídica está directamente acoplada a la catálisis enzimática.³⁸¹

1.2.4. Etiquetado con nanopartículas

Las proteínas pueden ser también modificadas con nanopartículas inorgánicas que presentan fluorescencia. Un ejemplo son los Qdots, nanocristales semiconductores que presentan un núcleo de selenio y cadmio, con coberturas exteriores de zinc y azufre. Comparadas con los fluoróforos orgánicos, tienden a ser más brillantes, fotoestables y muestran un espectro de emisión más estrecho.^{425,426} Los Qdots son partículas con un diámetro de entre 15 y 50 nm, significativamente más grandes que las proteínas fluorescentes, y según el tamaño presentan unas propiedades fotoquímicas u otras.³⁸⁰

Una alternativa a los Qdots que muestran propiedades físicas y ópticas muy similares, son los puntos cuánticos de carbono (Cdots, del inglés *carbon dots*). Estas partículas están fabricadas con carbono y dopadas con heteroátomos, haciendo que sean más biocompatibles y menos tóxicas.⁴²⁷ Los Qdots y los Cdots se unen a la proteína empleando métodos similares a los utilizados con los fluoróforos orgánicos.

1.3. Proteínas fluorescentes

Se denominan proteínas fluorescentes a los miembros de una clase de proteínas estructuralmente homólogas que, a partir de tres aminoácidos de su secuencia polipeptídica, son capaces de formar de manera autocatalítica un luminóforo que emite en la región visible del espectro electromagnético (380-750 nm). Shimomura y col.⁴²⁸ aislaron en la década de los 60 la primera de ellas, la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*), a partir de la medusa *Aequorea victoria* (avGFP). Posteriormente se han desarrollado gran número de variantes artificiales de la misma, además de aislarse otras proteínas luminiscentes producidas por diferentes organismos vivos, tales como corales, ascidias, pennatuláceos o anémonas.⁴²⁹

Sin importar la especie de la que provengan, o el grado de manipulación, todas ellas tienen un tamaño de aproximadamente 25 kD. Poseen una estructura de barril formado por 11 láminas- β unidas por hélices- α , con un diámetro de 24 Å y una altura de 42 Å, aproximadamente.⁴²⁹ El correcto plegamiento de la estructura de barril es indispensable para la formación del cromóforo autocatalítico con propiedades fluorescentes en su interior. Por otra parte, el hecho de que el cromóforo se encuentre protegido en el interior del barril incrementa su estabilidad y le aísla del medio, evitando así su desactivación por el oxígeno molecular u otras especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*).⁴³⁰

En el caso particular de la GFP, el cromóforo se forma a partir de tres aminoácidos adyacentes, la serina 65 (Ser65), la tirosina 66 (Tyr66) y la glicina 67 (Gly67). Tras el correcto plegamiento se produce una ciclación debido al ataque nucleófilo del grupo amino de la Gly67 al carbono del carbonilo de la Ser65, seguida de la oxidación del intermedio ciclado (**Figura 38**).

Por otro lado, la mutagénesis de sitio dirigido de estos aminoácidos, permite la obtención de mutantes que exhiben otros colores.⁴³¹ Por ejemplo, la sustitución de la Tyr66 por histidina o triptófano origina mutantes de color azul (Azurite) y cian (AmCyan), respectivamente.⁴³² Sin embargo, estas modificaciones de la avGFP no permiten conseguir toda la paleta de colores, utilizándose para ello otras proteínas fluorescentes de distinto origen. Por ejemplo, la proteína fluorescente roja (DsRed) se produce en el coral *Discosoma sp.*, y la síntesis precisa de una etapa más que para la maduración de la avGFP, mediante la extensión del sistema π -conjugado de los tres aminoácidos que forman el cromóforo (**Figura 38**).⁴³³ El descubrimiento de esta proteína permitió el desarrollo de proteínas fluorescentes que emiten a mayores longitudes de onda que las anteriores, con máximos de emisión de hasta 655 nm.⁴³⁴

Tabla 13. Proteínas fluorescentes y características espectroscópicas relevantes.⁴³⁵

	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	QY	Oligomerización
Azurite	383	447	26,200	0.55	wd
avGFP	395	509	25,000	0.79	d
T-Sapphire	399	511	44,000	0.6	wd
TagBFP	402	457	52,000	0.63	m
Cerulean	433	475	43,000	0.62	wd
mTurquoise	434	474	30,000	0.84	m
amCyan1	453	486	-	-	t
mTFP1	462	492	64,000	0.85	m
TurboGFP	482	502	70,000	0.53	d
SuperfolderGFP	485	510	83,300	0.65	wd
Emerald	487	509	57,500	0.68	wd
mWasabi	493	509	70,000	0.8	m
EYFP	513	527	67,000	0.67	wd
YPet	517	530	104,000	0.77	wd
ZsYellow1	529	539	20,000	0.65	t
mBanana	540	553	6,000	0.7	m
mOrange	548	562	71,000	0.69	m
mOrange2	549	565	58000	0.6	m
dTomato	554	581	69,000	0.69	d
TagRFP	555	584	100,000	0.48	wd
DsRed	558	583	72,500	0.68	t
mRuby	558	605	112,000	0.35	m
mTangerine	568	585	38,000	0.3	m
mStrawberry	574	596	90,000	0.29	m
Jred	584	610	44,000	0.2	d
mCherry	587	610	72,000	0.22	m
mPlum	590	649	41,000	0.1	m
mRaspberry	598	625	86,000	0.15	m
mNeptune	600	650	67,000	0.2	m

* ϵ : coeficiente de absorción molar; QY: rendimiento cuántico, m: monómero, d: dímetro, t: trímetro, wd: dímetro débil.

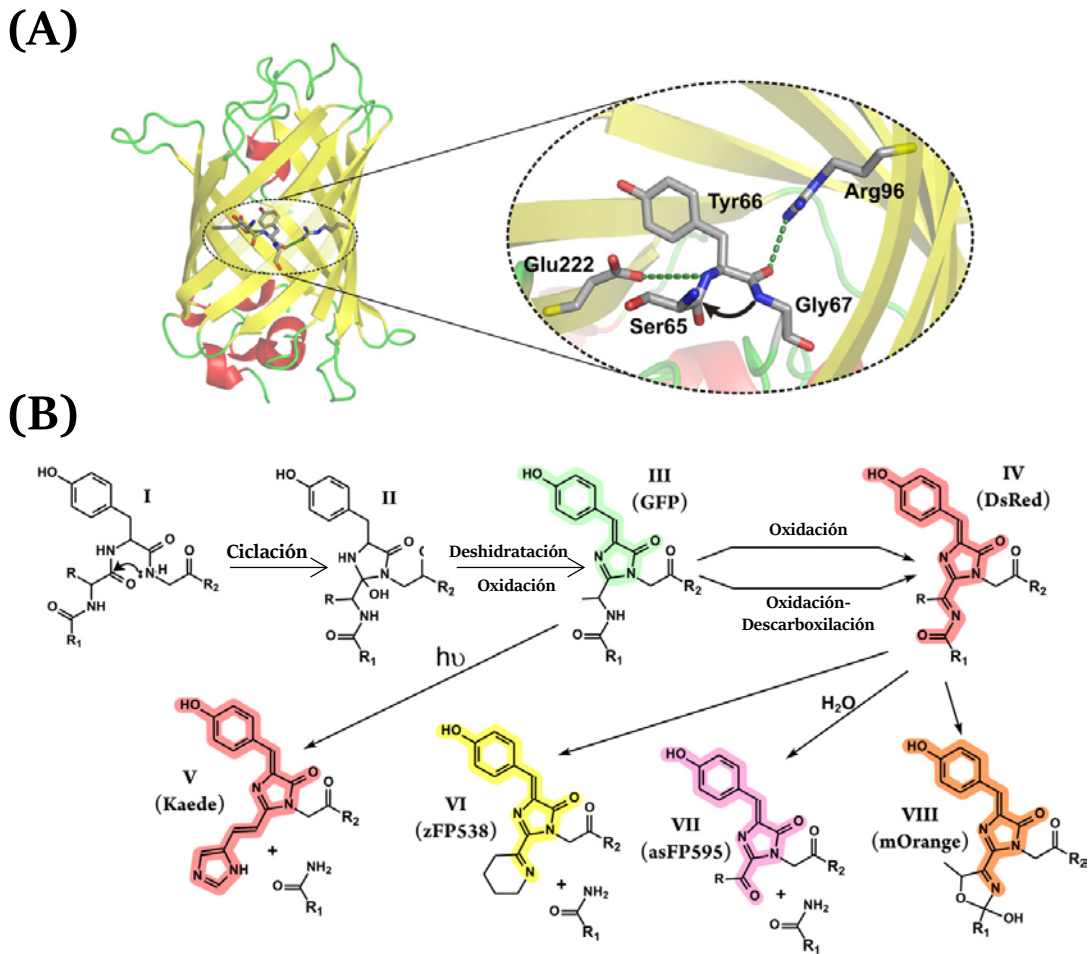


Figura 38. Reacciones postraduccionales y representación de los cromóforos de las proteínas de la familia de las GFP. **(A)** Estructura en forma de barril de la GFP con los aminoácidos que forman parte del cromóforo autocatalítico. **(B)** Biosíntesis de los cromóforos y diversidad de sus estructuras, en color se muestran los sistemas π -conjugados. Adaptado de la referencia ⁴³⁶.

Por otro lado, no solo se han realizado mutaciones para variar los colores de las proteínas, sino también para aumentar el brillo, mejorar el plegamiento y el tiempo que éste conlleva, evitar la oligomerización, acelerar la formación del cromóforo o mejorar la fotoestabilidad y la resistencia al pH.^{434,437,438}

Las proteínas fluorescentes se han usado para una amplia variedad de aplicaciones, empleándose como etiquetas fluorescentes universales codificadas genéticamente. En particular suelen aplicarse para monitorizar la expresión de genes en bacterias, para las imágenes de células vivas o de organismos o en sistemas FRET donde se usan proteínas diferentes como donantes yceptoras o para el desarrollo de bioensayos y biosensores.^{379,437,439-443}

En la presente Tesis Doctoral han aplicado las proteínas fluorescentes EmeraldGFP (EmGFP) y mOrange2 en el desarrollo de un bioensayo para la determinación de FK506 en sangre de pacientes transplantados.

La EmGFP proviene de la avGFP a partir de las mutaciones S65T, S72A, N149K, M153T, I167T. La mutación S65T disminuye la fluorescencia del primer máximo de excitación de la GFP original, aumentando la del segundo máximo que se desplaza a 487 nm.⁴⁴⁴ Presenta un único máximo de emisión a 509 nm, un $\Phi_f = 0.68$ y un coeficiente de absorción molar de $57500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.⁴⁴⁵ Por su parte, la mOrange2 proviene de la DsRed tras múltiples ronda de mutagénesis. Se trata de una proteína monomérica, 25 veces más fotoestable que su predecesora la mOrange y sensible parcialmente al pH. Posee un máximo de excitación a 549 nm, un máximo de emisión a 565 nm, un $\Phi_f = 0.6$ y un coeficiente de absorción molar de $58000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.³⁹⁶

1.4. Micromotores

En 1959, Richard Feynman conjeturó en su conferencia “There’s Plenty of Room at the Bottom” (Hay mucho espacio en el fondo)⁴⁴⁶, el fundamento conceptual de la nanotecnología. Unos años más tarde, en 1966, Isaac Asimov continuó con esta idea de emplear la nanotecnología como herramienta médica al publicar la novela “The Fantastic Voyage”. Sin embargo, no ha sido hasta hace unos años cuando esta inspiración de la ciencia-ficción ha comenzado a hacerse realidad con el desarrollo de partículas en la escala micro y nanométrica que presentan propiedades autómatas. Aun no existe consenso en la literatura en relación a la nomenclatura empleada para estos objetos microscópicos; los términos que se utilizan con mayor frecuencia son, micro/nano-motores, micro/nano-robots o micro/nano-nadadores, aunque también pueden denominarse utilizando términos más descriptivos según su forma (ej. microtubos⁴⁴⁷ o microhélices⁴⁴⁸), sus componentes (ej. bacteriobot⁴⁴⁹ o espermabot⁴⁵⁰) o su comportamiento (ej. microcohetes⁴⁵¹ o microherramienta⁴⁵²).

Un micromotor está formado por dos partes fundamentales: un motor encargado de la propulsión a partir de una fuente de energía y una unidad de trabajo que va a depender de la aplicación final del dispositivo.⁴⁵³ Uno de los grandes problemas asociados

a estos sistemas es la microminiaturización de las fuentes de energía, necesitando alternativas de propulsión y control a los usados a escala macroscópica, como los motores de combustión.⁴⁵⁴ También es necesario tener en cuenta los principios físicos que rigen el comportamiento del micromotor, ya que la locomoción en un entorno con un número de Reynolds bajo está fuertemente afectado por el movimiento browniano.⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁷

El diseño, fabricación y aplicación de estos sistemas autómatas es multidisciplinar, si bien uno de los pilares fundamentales es la bioquímica. De hecho, en la naturaleza existen motores biológicos que han servido de inspiración para transformar la energía en movimiento y fuerza. Algunos ejemplos destacables son la kinesina,⁴⁵⁸ o el movimiento flagelar de algunas bacterias.

El tamaño, la forma y el mecanismo de propulsión de los micromotores determina su campo aplicación. Los micromotores han demostrado ser muy prometedores para diversas aplicaciones, tanto en el campo biomédico (ej. transporte de medicamentos, microcirugía, inseminación artificial, imaging y sensado) como en el ambiental (ej. eliminación de contaminantes, en desinfección y sensado).^{453,459-461} Un ejemplo interesante es su utilización como materiales para la detección de compuestos en diferentes aplicaciones basadas en transducción óptica. En este sentido, la monitorización de los cambios producidos en la luminiscencia de ciertas sustancias en un entorno líquido o en el propio micromotor, ha permitido el desarrollo de dispositivos para la detección de diferentes fármacos en aplicaciones biomédicas. Cabe destacar que, hasta el momento, no se han aplicado para la detección y cuantificación de inmunosupresores.

Una de las grandes ventajas de la aplicación de los micromotores en sistemas de sensado, es su capacidad de capturar “al vuelo” las moléculas de interés que se encuentran en matrices complejas (ej. sangre y orina), sin la necesidad de purificar o concentrar la muestra.⁴⁵³ Esto se debe a que el movimiento de los micromotores puede crear flujos turbulentos que proporcionan una micromezcla eficiente, mejorando la transferencia de masa y favoreciendo aún más la interacción entre la superficie activa y los compuestos de interés y, en consecuencia, reduciendo el tiempo de reacción o de detección.⁴⁶² Además, estos sistemas pueden integrarse fácilmente dentro de kits sencillos y biosensores portátiles.

1.4.1. Métodos de propulsión

Se necesitan mecanismos de propulsión fiables para evitar las limitaciones asociadas al movimiento en números de Reynold bajos. Mientras que la aleatorización browniana conduce a movimientos estocásticos que necesitan otras fuentes de energía para lograr un movimiento dirigido.⁴⁶³ Los micromotores pueden clasificarse en tres grupos principales según los mecanismos de propulsión: (a) micromotores alimentados químicamente (catalíticos); (b) micromotores sin combustible alimentados por fuentes biocompatibles (fuentes de energía magnética, ultrasónica y térmica), y (c) micromotores híbridos.

1.4.1.1. Micromotores alimentados químicamente (catalíticos)

Son motores autónomos que se mueven por sí solos con ayuda de combustible y no precisan de campos externos para dirigir su movimiento. Se producen reacciones asimétricas en la superficie del micromotor que dan lugar a la propulsión, de forma que el combustible forma parte de los compuestos del medio líquido. La propulsión depende de cuatro mecanismos, que pueden darse de manera individual o combinada: auto-electroforesis, auto-difusión forética, propulsión por burbujas y enzimática.

- *Auto-electroforesis*: los micromotores se propulsan aplicando un campo eléctrico que induce un movimiento de cargas a lo largo de una superficie y en el fluido que lo rodea, generándose un flujo de fluido alrededor del objeto conocido como electroforesis.⁴⁶⁴ En los micromotores, estos campos eléctricos pueden inducirse mediante reacciones catalíticas asimétricas del combustible en el ánodo y el cátodo, que provocan un gradiente de iones y un dipolo local (**Figura 39A**).^{465,466} En todos los casos, tienen una morfología de varilla bimetálica.

- *Auto-difusión forética*: los micromotores se propulsan por la difusión de las moléculas del disolvente y de las especies producidas durante la reacción química que se produce en la superficie de los motores, originando un gradiente de concentraciones y de presión.^{464,467} Para que se produzca, es necesario que los motores posean cierta asimetría superficial, por lo que se emplean motores esféricos de tipo Janus (**Figura 39B**).

• *Propulsión por burbujas*: en estos micromotores, durante la reacción química las moléculas de gas generadas se acumulan formando burbujas. La liberación continua de burbujas genera un movimiento de empuje neto a través de una fuerza de retroceso.⁴⁶⁸ El empleo de micromotores con una estructura tubular, donde la reacción catalítica se produce en la cavidad interior, puede ayudar al desarrollo y migración de las burbujas. Sin embargo, también pueden emplearse micromotores esféricos si se produce una fuerza neta suficiente al generarse y desprenderse las burbujas (**Figura 39C**).^{469,470}

• *Enzimática*: una de las limitaciones para el empleo de los micromotores en sistemas biológicos es la incompatibilidad de los materiales y combustibles que se utilizan. Por ello, se ha demostrado que el uso de enzimas permite convertirlos en materiales biológicamente compatibles. Estas enzimas pueden aportar movilidad a los motores^{471,472} o actuar como microbombas moviendo el fluido, si se encuentran inmovilizadas en su superficie.⁴⁷³

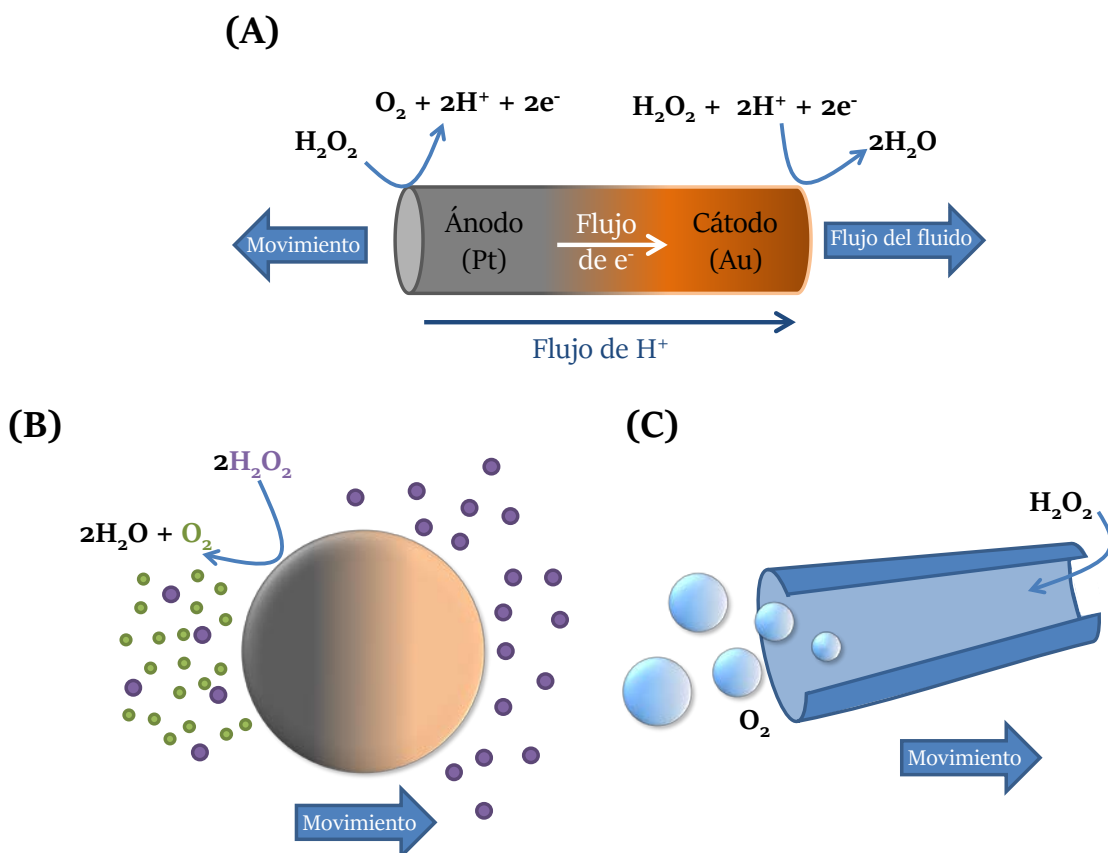


Figura 39. Esquema de los mecanismos de propulsión de los micromotores: (A) Propulsión por auto-electroforésis, (B) propulsión auto-difusioforética, y (C) propulsión por burbujas.

1.4.1.2. Micromotores alimentados por fuentes de propulsión externa

Los micromotores catalíticos no son aptos para todas las aplicaciones, ya que los combustibles o los subproductos generados pueden ser tóxicos en entornos biológicos. Por otro lado, los mecanismos en los que se generan gradientes iónicos no funcionan en entornos salinos, como las muestras sanguíneas o de orina. Una alternativa es la aplicación de campos externos, donde el movimiento, dirección y la velocidad pueden modularse al variar las condiciones de aplicación del campo externo. Una de las desventajas del empleo de este tipo de propulsión es que precisa de un equipo externo que genere el campo, lo que puede limitar su aplicación.⁴⁵⁴

Según el tipo de campo empleado pueden clasificarse en:

- *Fotodirigidos*: se tratan de motores propulsados por luz que presentan en su estructura un fotocatalizador que genera pares electrón-hueco para impulsar reacciones químicas.⁴⁷⁴ Su morfología puede ser tubular,⁴⁷⁵ esférica⁴⁷⁶ o incluso de alambre en forma de microárbol.⁴⁷⁷

- *Magnéticos*: son micromotores que contienen un material magnético en su estructura, el cual se alinea al aplicar un campo magnético externo. Los campos magnéticos aplicados para la propulsión de los micromotores pueden ser rotatorios⁴⁷⁸ o helicoidales,⁴⁷⁹ dependiendo de la estructura del micromotor.

- *Eléctricamente dirigidos*: la propulsión se lleva a cabo gracias a la movilidad electroforética producida por una corriente eléctrica continua. Al poner los micromotores en disolución la superficie adquiere una pequeña carga debido a la ionización de las moléculas de la capa exterior, de forma que son atraídos por un campo eléctrico.⁴⁸⁰ Modificando los materiales de fabricación puede ajustarse la dinámica de movimiento de los micromotores.⁴⁵⁹

- *Ultrasonidos*: se basa en el empleo de ondas acústicas de alta frecuencia (MHz) que crean un gradiente de presión localizado que actúa asimétricamente sobre los micromotores. Las ondas de ultrasonido son capaces de hacer que los micromotores leviten, se propulsen, roten, alineen o se ensamblen, tanto en agua como en disoluciones de alta fuerza iónica.⁴⁸¹

1.4.1.3. Híbridos

Para conseguir sistemas con un mayor grado de control, se están estudiando los sistemas de propulsión ortogonales. Para ello se emplean micromotores multicomponente, en los que la mezcla de materiales confiere un mayor ajuste de la dirección y la velocidad al usar diferentes tipos de propulsión. Ejemplos de este tipo de sistemas pueden ser los micromotores multimetálicos propulsados acústicamente cuya dirección se controla mediante campos magnéticos,⁴⁸² o micromotores propulsados catalíticamente cuyo comportamiento y velocidad se controla con el campo externo, el cual dependerá de las propiedades del micromotor.^{483,484}

1.4.2. Fabricación de motores

Se han descrito muchos métodos para la síntesis de micromotores. La selección dependerá, entre otros factores, de los materiales utilizados, del formato de ensayo, de la forma escogida para el motor y del tipo de propulsión. A continuación, se describen algunos de los métodos de fabricación más empleados.

Uno de los primeros métodos descritos para la síntesis de motores es la electrodeposición. Se trata de un método rápido y de bajo coste en el que la reducción de disoluciones de sales metálicas provoca el crecimiento de los motores dentro de un molde.⁴⁸⁵ La longitud de los motores se puede controlar a partir de la carga empleada,^{486,487} y la alternancia secuenciada de disoluciones con diferentes composiciones que permiten generar diferentes capas metálicas en un mismo motor.⁴⁸⁸ Por lo general, con este tipo de técnica se obtienen motores con forma de alambre o varilla, ya que se emplean como moldes membranas de alúmina o policarbonato, que presentan poros cilíndricos (**Figura 40A**). Además, pueden conseguirse formas más complejas, como muelles, depositando de manera simultánea varios metales y disolviendo selectivamente uno de ellos.⁴⁸⁹ La electrodeposición no solo se emplea para fabricar motores macizos sino que, al llevar a cabo una síntesis de deposición más rápida, pueden conseguirse motores tubulares, los cuales presentan un núcleo hueco. En estos casos, se emplean precursores de electropolímeros orgánicos y disoluciones de sales

metálicas, para obtener una capa externa que confiera al motor la funcionalidad deseada y capas internas metálicas encargadas de la propulsión, respectivamente.

Otra técnica empleada para la fabricación de motores con diferentes morfologías es la fotolitografía. En ella se exponen materiales fotopoliméricos a una fuente de luz a través de una máscara o plantilla, de tal forma que las regiones tapadas por la plantilla no polimerizan y pueden eliminarse fácilmente (**Figura 40B**). Una alternativa es la escritura directa con láser, que permite la creación de microestructuras poliméricas en 3D de manera precisa, con alta resolución y sin la necesidad de emplear plantillas.⁴⁹⁰ En su lugar se emplea un haz focalizado que permite polimerizar el material con la forma deseada, sin tener que limitarse a una sección transversal fija. Un inconveniente de las técnicas fotolitográficas es que únicamente funcionan con materiales poliméricos fotosensibles. Sin embargo, puede combinarse con otros materiales, que pueden depositarse en la superficie después de la fabricación,⁴⁹¹ emplear nanopartículas mezcladas junto con el polímero precursor,⁴⁹² o pueden utilizarse patrones fotolitográficos como plantillas para la fabricación con otros materiales.⁴⁵⁴

La deposición de vapor (**Figura 40C**) es otra técnica muy utilizada para la fabricación de motores, que facilita la integración de las propiedades magnéticas o catalíticas.⁴⁹³ Consiste en la vaporización de un material sólido, bien térmicamente o usando una fuente de energía, como un haz de electrones de alta potencia, sobre un sustrato formando una fina capa de material orientado hacia la fuente.⁴⁹⁴ Por lo general, la deposición de vapor es el método más común para fabricar motores esféricos tipo Janus, partiendo normalmente de partículas esféricas de sílice o poliestireno. Para mejorar la limitada diversidad funcional que presenta la deposición de vapor convencional, se ha desarrollado la configuración de ángulo rasante (GLAD, del inglés *glancing angle deposition*). En el GLAD la deposición se lleva cabo con un ángulo flexible frente a la dirección vertical empleada en la deposición convencional (**Figura 40D**).⁴⁹⁵ De esta forma pueden depositarse diferentes materiales cambiando el ángulo entre la fuente y el sustrato. Controlando la tasa de vapor y el giro del sustrato puede ajustarse el grosor de la capa y la estructura geométrica, obteniéndose motores con diversas morfologías, por ejemplo con forma de renacuajo,⁴⁹⁶ de L⁴⁹⁷ o hélices.⁴⁹⁸

Los denominados motores enrollados se obtienen al hacer deposiciones sobre una capa de polímero, producida mediante fotolitografía. Al depositar películas delgadas de diferentes materiales se producen grandes tensiones, que pueden provocar la curvatura de las capas (**Figura 40E**).⁴⁹⁹ Seleccionando los materiales adecuados, así como su espesor, se puede controlar la formación de estructuras tubulares,⁴⁶⁸ helicoidales⁵⁰⁰ o con pliegues.⁵⁰¹

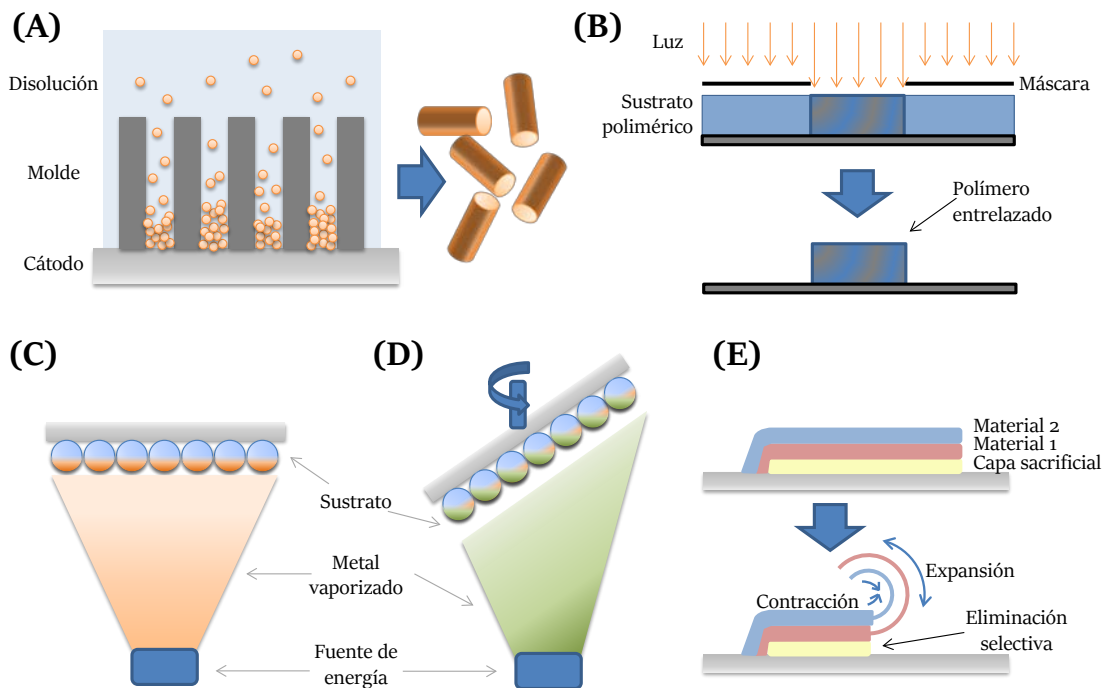


Figura 40. Esquema de algunos de los métodos de síntesis de micromotores. **(A)** Electrodeposición, **(B)** fotolitografía, **(C)** deposición de vapor, **(D)** GLAD y **(E)** motores enrollados.

Por otro lado, los micromotores esféricos de tipo Janus, se caracterizan por tener diferenciadas en la misma superficie dos o más propiedades físicas distintas, lo que permite que se produzcan de manera simultánea dos tipos de reacciones.⁵⁰² Dicha estructura asimétrica va a influir notablemente en su propulsión eficiente, así como en la funcionalización selectiva para mejorar las capacidades de detección o la compatibilidad biológica.⁵⁰³ A parte de la estrategia de la deposición de vapor de finas capas metálicas sobre microesferas para conseguir la asimetría, existen otras muchas vías sintéticas.⁵⁰⁴ Entre ellas cabe destacar los métodos de emulsión Pickering, donde una emulsión

polimérica se estabiliza con partículas sólidas situadas en la interfase;⁵⁰⁵ el autoensamblaje de polímeros⁵⁰⁶ o la electroquímica bipolar.⁵⁰⁷

En la presente Tesis Doctoral se han evaluado tanto micromotores tubulares poliméricos, sintetizados mediante electrodeposición en membrana, como micromotores esféricos Janus, sintetizados mediante una emulsión polimérica estabilizada por partículas magnéticas.

2. Objetivos

Este capítulo de Tesis describe el desarrollo de bioensayos basados en medidas de fluorescencia para la determinación del inmunosupresor FK506 en sangre de pacientes trasplantados, empleando proteínas recombinantes. Para ello se ha sintetizado la proteína FKBP1A fusionada con la proteína fluorescente EmGFP o mOrange2, utilizando un separador de GS entre los dos dominios y añadiendo una cola de 6 histidinas para su purificación.

Para la obtención de las distintas proteínas de fusión se han preparado dos vectores de expresión de tipo plásmido para su expresión en *E. coli*. La primera construcción genética codificante integra el dominio N-terminal de la proteína FKBP1A y la proteína fluorescente situada a continuación. En el segundo caso, la proteína FKBP1A se situó en el extremo C-terminal de la proteína fluorescente. De esta forma se pueden evaluar posibles impedimentos estéricos o dificultades en el plegamiento.

Los objetivos específicos planteados en este Capítulo se describen a continuación:

- Diseño y preparación de los vectores de expresión que codifican las proteínas de fusión formadas por el receptor FKBP1A y las proteínas fluorescentes mOrange2 o EmGFP en *E.coli*.
- Producción y purificación de las proteínas de fusión formadas por el receptor FKBP1A y las proteínas fluorescentes mOrange2 y EmGFP.
- Caracterización espectroscópica de las proteínas recombinantes producidas, así como su interacción con el fármaco FK506.
- Desarrollo y optimización de un bioensayo para la determinación de FK506, basado en medidas de fluorescencia, empleando las proteínas FKBP1A-FP y partículas magnéticas. Aplicación del ensayo optimizado al análisis de muestras de sangre de pacientes trasplantados.
- Desarrollo y optimización de un bioensayo para la determinación de FK506, basado en medidas de fluorescencia, empleando la proteína FKBP1A-EmGFP y micromotores Janus propulsados magnéticamente.

3. Materiales y métodos

3.1. Síntesis y expresión de proteínas fluorescentes

3.1.1. Reactivos

- *N*-hidroxisulfosuccinimida (sNHS, Fluorochem).
- 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Fluorochem).
- Imidazol (Merck).
- Extracto de levadura (Conda).
- Glicerol (Fisher Scientific).
- Betaína (Sigma).
- Triptona (Conda).
- Glucosa (Merck).
- Isopropil- β -D-tio-falactósido (IPTG, Thermo Fisher).
- Agar (Conda).
- Cloruro sódico (Quimipur).
- Cloruro potásico (Riedel-de Haën).
- Cloruro de magnesio (Merck).
- Agarosa (Conda).
- Agua Milli-Q (MilliPore).
- Sulfato de kanamicina de *Streptomyces kanamyceticus* (Sigma-Aldrich). La disolución patrón del antibiótico se preparó a una concentración de 50 mg/mL utilizando agua purificada mediante un sistema milli-Q (Millipore) y autoclavada. Para su conservación, se esterilizó por filtración y se congeló a -20 °C.
- NEBuilder HiFi DNA Assambly Master Mix (New England BioLabs).
- DNA polimerasa Phusion Hot Start II (Thermo Fisher).
- Mix de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP, Thermo Scientific).
- Marcador de proteínas preteñido PageRuler™ de 10 – 180 kDa (Thermo Scientific).
- QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (Qiagen).
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).
- PD-10 Desalting Colums (GE Healthcare).

- Columna HisTrap FF crude de 1 mL (GE Healthcare).
- Ensayo de proteínas Pierce™ BCA™ (Thermo Fisher).
- Tampón de lisis de células bacterianas (NZYTech).

3.1.2. Disoluciones y agentes bloqueantes

- Tampón fosfato sódico salino (PBS, Sigma): fosfato 10 mmol/L, NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, pH 7.5.
- Tampón de unión: fosfato sódico 20 mmol/L, NaCl 500 mmol/L, imidazol 20 mmol/L, pH 7.4.
- Tampón de elución: fosfato sódico 20 mmol/L, NaCl 500 mmol/L, imidazol 500 mmol/L, pH 7.4.
- Tampón de aplicación: glicerol al 10% (v/v), SDS al 3% (p/v), Tris-base pH 6.8 al 12,1% y azul de bromofenol al 0.2% (p/v).
- Tampón de desarrollo: 0.3% Tris-base pH 8.4 al 0.3% (p/v), glicerol al 0.14% (p/v) y SDS al 0.1%.
- Tampón PBST: PBS conteniendo T20 al 0.1% (v/v).

3.1.3. Microorganismos

Se utilizan bacterias químicamente competentes *E. coli* NEB 5-alpha (New England Biolabs) para la perpetuación del vector y *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión de las proteínas de fusión.

3.1.4. Vectores

Los plásmidos comerciales FKBP1A-pDONR221 (DNASU), pRSET-EmGFP (Invitrogen) y pmOrange2 (Clontech) se usaron como fuente de las secuencias codificantes de *FKBP1A*, *EmGFP* y *mOrange2*, respectivamente.

El plásmido utilizado para la expresión de las proteínas de fusión fue el pQE-T7-2 (Qiagen) de 5.3 kb, que presenta el promotor T7, un sitio de clonaje múltiple, y confiere resistencia a la kanamicina.

3.1.5. Cebadores

Los cebadores (Integrated DNA Technologies) usados se encuentran recogidos en la **Tabla 14**, donde F.P. hacen referencia a los cebadores directos (del inglés, *forward primer*) y R.P. a los cebadores reversos (del inglés, *reverse primer*).

Tabla 14. Secuencias de los cebadores empleados.

Nombre	Secuencia
F.P.-HFGO-F	5'-ATC ACC ATG AAA ACC TGT ATT TTC AGT CCG GAG TGC AGG TG-3'
R.P.-HFGO-F	5'-TTG CTC ACC GAA CCT CCA CCT TCC AGT TTT AGA AG-3'
F.P.-HFGO-O	5'-GGT GGA GGT TCG GTG AGC AAG GGC GAG-3'
R.P.-HFGO-O	5'-GCA GCC GGA TCT TAC TAC TTG TAC AGC TCG TC-3'
F.P.-HOGF-F	5'-TAC AAG GGT GGA GGT TCG GGA GTG CAG GTG-3'
R.P.-HOGF-F	5'-GCA GCC GGA TCT TAC TAT TCC AGT TTT AGA AG-3'
F.P.-HOGF-O	5'-ATC ACC ATG AAA ACC TGT ATT TTC AGA GCG TGA GCA AGG GC-3'
R.P.-HOGF-O	5'-TCC CGA ACC TCC ACC CTT GTA CAG CTC GTC-3'
F.P.-pQE	5'-TAG TAA GAT CCG GCT G-3'
R.P.-pQE-O/G	5'-ATA CAG GTT TTC ATG GTG ATG GTG ATG ATG CAT ATG ATT TAT ATC TCC TTC TT-3'

3.1.6. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se autoclavan a 121 °C durante 20 min.

- Low Salt Luria-Bertani (LB): 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl, 15 g/L agar (solo en medio sólido), antibiótico.
- S.O.C: 0.5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L MgSO₄ 20 mmol/L glucosa.

3.1.7. Instrumentación

- Espectrofotómetro Varian Cary-3 Bio para la realización de espectros de absorción (UV-vis).
- Espectrofluorómetro Horiba Fluoromax-4TCSPC equipado con una lámpara de xenón de 150 W como fuente de excitación, para las medidas de los espectros de emisión de las proteínas fluorescentes.
- Centrífuga miniSpin (Eppendorf AG).
- Centrífuga 5810 R (Eppendorf AG).

- Termociclador Sure Cycle 8800 (Agilent Technologies).
- Sistema Mini-Protean III (Bio-Rad).
- Autoclave MED 12 (Selecta).
- Espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific).
- Incubador (Mettmert).
- Campana de seguridad biológica de clase II Biostar (Telstar).
- Balanza analítica Mettler AT261 DeltaRange[®] con 0.01 mg de sensibilidad.
- Sonda de ultrasonidos (P-Selecta, España).
- pH-metro Crison GLP 21.
- Agitador vortex (Bio-vortex, España).
- Agitador orbital KS 4000i (IKA).
- Material analítico de calidad contrastada.
- Tubos de polipropileno cónicos de 15 y 50 mL (Thermo Fisher).
- Programa de tratamiento y procesado de datos OriginPro 2016, Microsoft Excel 2016 y MARS (BMG labtech).

3.1.8. Producción de las proteínas recombinantes FKBP-FP

3.1.8.1. Construcción de los plásmidos pFKBP1A-FP

El clonaje de los genes y construcción de los plásmidos se llevó a cabo empleando el kit de ensamblaje de DNA NEBuilder HiFi. Este método⁵⁰⁸ permite ensamblar varios fragmentos en una única etapa sin importar la longitud de estos ni la compatibilidad de los extremos, tan solo es necesaria una superposición de las secuencias de los fragmentos a unir de entre 15 y 30 bp. La mezcla comercial contiene: (a) una exonucleasa, encargada de crear extremos 3' de una sola hebra, lo que facilita la hibridación de los fragmentos que contienen una complementariedad de secuencia; (b) una polimerasa, que se encarga de rellenar los espacios que puedan quedar vacíos tras la hibridación; y (c) una ligasa, que une los fragmentos ensamblados. Un esquema de su funcionamiento puede verse en la **Figura 41**.

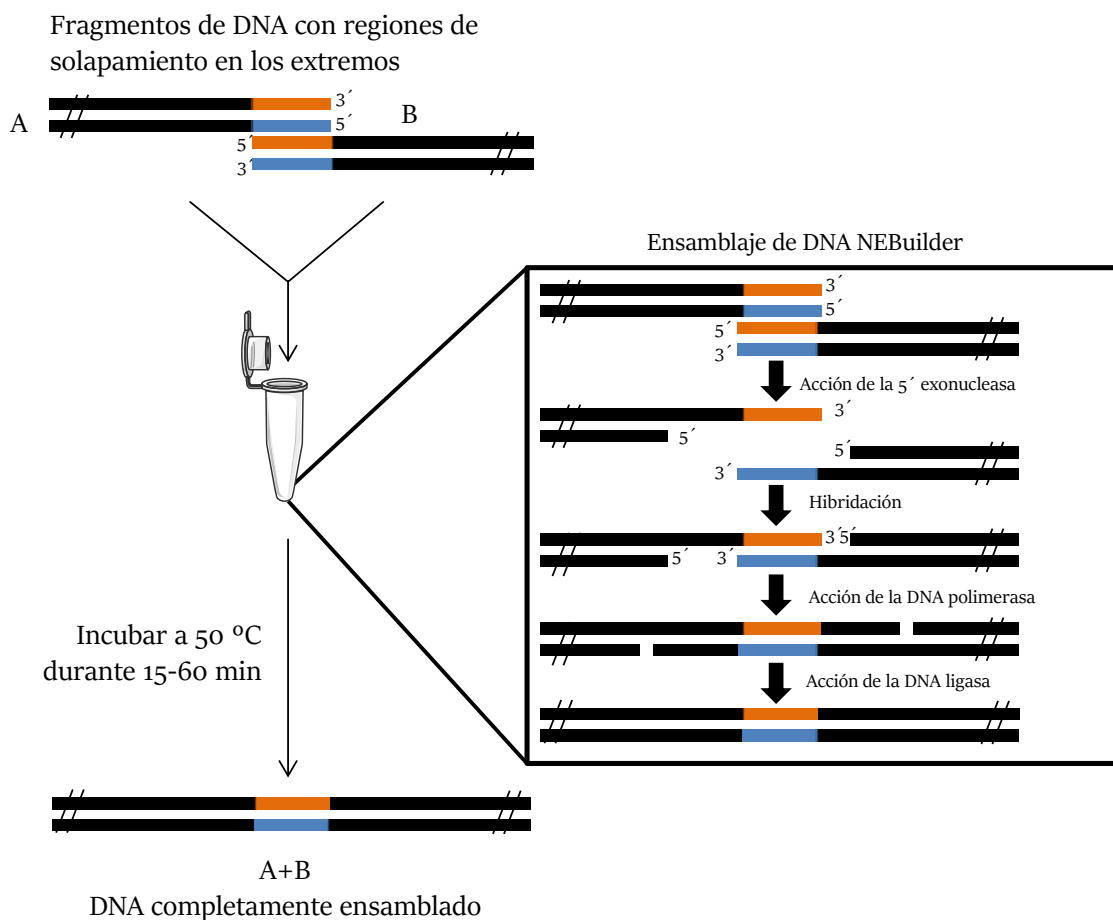


Figura 41. Descripción del método de ensamblaje empleado para la construcción de los vectores de expresión de las proteínas recombinantes.

a) Amplificación de los fragmentos

Las secuencias codificantes de *FKBP1A*, *EmGFP* y *mOrange2* y el vector pQE-T7-2, se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando cebadores (**Tabla 14**) que introdujeran las regiones de solapamiento necesarias para el ensamblaje. Para ello, se prepararon mezclas de reacción que contenían 2.5 μL de cada cebador (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μL de DNA polimerasa Phusion Hot Start II, 5 μL de la mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) (2 mmol/L de cada uno), 5 μL de betaína (5 mol/L) y 10 μL de tampón Phusion HF (5X). A la mezcla se le añadieron 5 μL de la plantilla de DNA (0.1 ng/mL) y se completó con agua destilada estéril hasta 50 μL .

Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador Sure Cyclyer 8800, comenzando la reacción con 1 min de desnaturalización a 98 °C seguido de 30 ciclos de: 10 s de desnaturalización a 98 °C, 30 s de hibridación a la temperatura específica de los

cebadores (**Tabla 15**), y 30 s (genes) o 2 min 30 s (vector) de elongación a 72 °C. Para completar la reacción se añade una extensión adicional de 7 min a 72 °C.

Tabla 15. Parejas de cebadores empleados en las amplificaciones PCR para cada una de las plantillas génicas usadas para construir los vectores de expresión de las proteínas fluorescentes, junto con las temperaturas de hibridación (T_m) de cada pareja y el tamaño de los amplicones obtenidos en las PCR.

	Plantilla	Cebadores	T _m		Tamaño amplicón
HisTag-FKBP1A-FP	FKBP	F.P.-HFGO-F/RP-HFGO-F	45.9 °C	C	370 bp
	mOrange2	F.P.-HFGO-O/RP-HFGO-O	55.7 °C	D	734 bp
	EmGFP	F.P.-HFGO-O/RP-HFGO-O	55.7 °C	E	743 bp
HisTag-FP-FKBP1A	FKBP	F.P.-HOGF-F/RP-HOGF-F	45.9 °C	F	356 bp
	mOrange2	F.P.-HOGF-O/RP-HOGF-O	50.6 °C	G	749 bp
	EmGFP	F.P.-HOGF-O/RP-HOGF-O	50.6 °C	H	758 bp
Vector	pQE-T7-2	F.P.-pQE/RP-pQE-O/G	54.4 °C	A	5245 bp

Para comprobar la correcta amplificación de los fragmentos, se estimaron sus tamaños mediante electroforesis empleando geles de agarosa al 1%.

Los amplicones recombinantes se purificaron con el kit de purificación QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial, y su concentración se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop.

b) Ensamblaje de los genes codificantes de las proteínas quimeras

Se ensamblaron tres fragmentos diferentes para cada una de las construcciones: el vector, el inserto del gen *FKBP1A* y el inserto del gen de la proteína fluorescente (*EmGFP* o *mOrange2*). Para hacer posible el ensamblaje entre los fragmentos, se emplearon amplicones con zonas complementarias de recombinación.

La reacción de ensamblaje se preparó en hielo, mezclando aproximadamente 30 fmol del vector con los insertos génicos en una proporción molar vector:inserto1:inserto2 de 1:2:2. Sobre esa mezcla se añadieron 10 µL de la mezcla de ensamblaje NEBuilder HiFi DNA y agua desionizada autoclavada hasta un volumen final de 20 µL. Las muestras se incubaron en el termociclador a 50 °C durante 15 min. Tras la incubación, las muestras se guardaron a -20 °C hasta su posterior perpetuación.

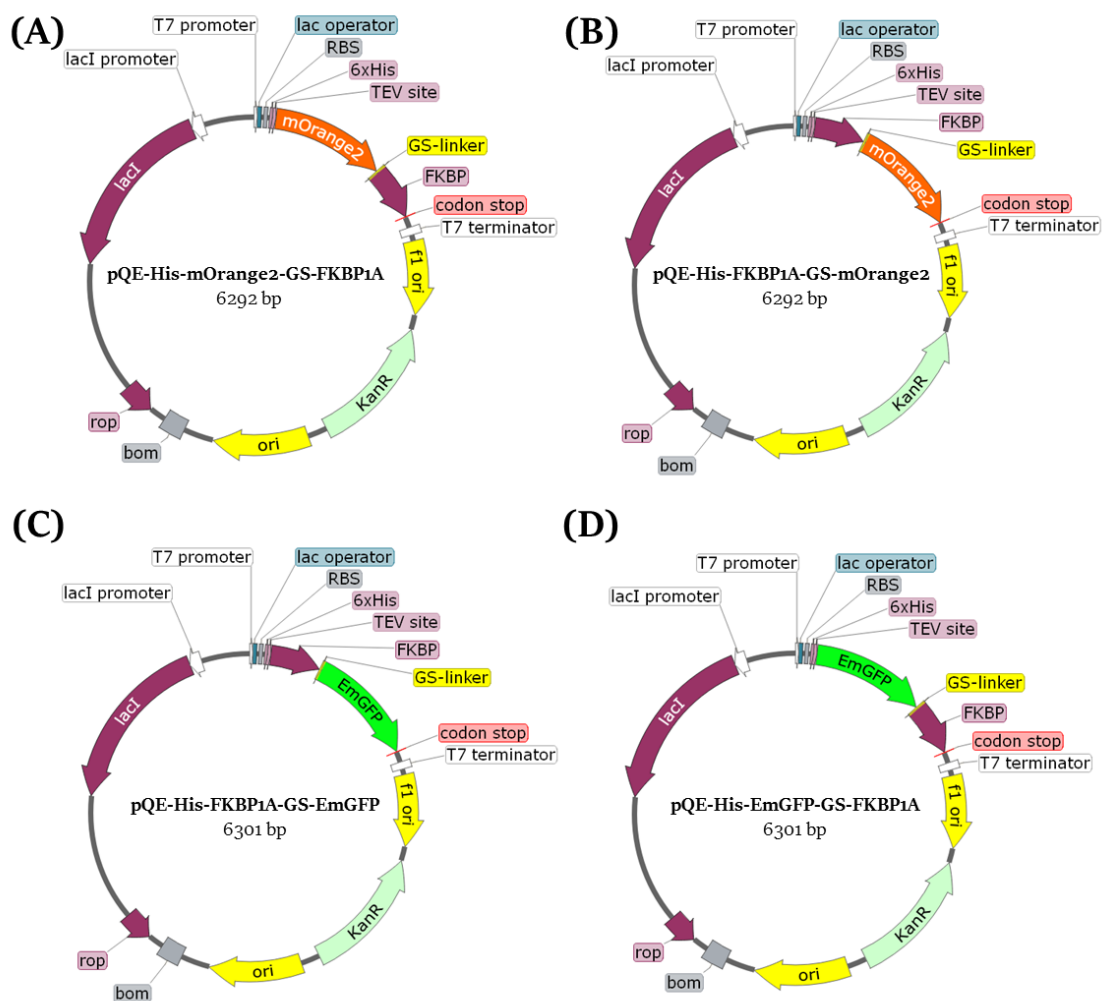


Figura 42. Esquemas de las construcciones de los plásmidos (A) pQE-mOrange2-FKBP1A, (B) pQE-FKBP1A-mOrange2, (C) pQE-FKBP1A-EmGFP y (D) pQE-EmGFP-FKBP1A.

c) Perpetuación de los plásmidos

Los plásmidos ensamblados para las cuatro construcciones preparadas, se propagaron en células químicamente competentes de *E. coli* (NEB 5-alpha) mediante choque térmico. Las bacterias se sembraron en platos de LB y se seleccionaron por su resistencia a la kanamicina (50 µg/mL).

Se seleccionaron varias colonias individuales para cada construcción, inoculándose en LB e incubando a 37 °C durante 16 h. Se tomó una alícuota de cada medio, se añadió glicerol hasta una concentración final del 15% conservándose a -80 °C. Finalmente, las células se recogieron por centrifugación (6800×g, 3 min). El pellet se trató con el kit

comercial QIAprep Spin Miniprep Kit para extraer y purificar el plásmido, el cual se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop.

Los plásmidos construidos y purificados se secuenciaron para confirmar el correcto ensamblaje de los genes.

3.1.8.2. Transformación de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3)

Se emplearon bacterias *E.coli* BL21 (DE3), que son compatibles con el promotor T7 del vector de expresión pQE-T7-2. Para ello, se descongeló en hielo una alícuota de 50 μ L de las bacterias, se añadió 1 μ L del plásmido y se mezcló volteando el tubo. Tras una incubación en hielo de 30 min, se calentó la mezcla a 42 °C durante 1 min. El tubo se mantuvo en hielo durante 2 min, antes de añadir 950 μ L de medio SOC. A continuación, se incubó el tubo con agitación vigorosa a 37 °C. Transcurrida una hora, se sembraron 50 y 300 μ L del cultivo de células transformadas en placas de LB, conteniendo 50 μ g/mL de kanamicina. Las placas se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 16 h.

3.1.8.3. Expresión de las proteínas de fusión en *E. coli* BL21 (DE3)

Con el fin de obtener la cantidad de biomasa adecuada, se llevó a cabo el crecimiento de los clones recombinantes como paso previo a la inducción de la expresión de la proteína correspondiente. Para ello, se creció un preinóculo en medio LB en presencia de kanamicina (50 μ g/mL) y se incubaron los cultivos a 37 °C con agitación (200 rpm) durante 16 h. Para mantener una aireación adecuada, los volúmenes de cultivo utilizados fueron 1/10 del volumen nominal del material empleado. Una alícuota del preinóculo se conservó con glicerol al 15% a -80 °C.

A continuación, se inoculó LB-kanamicina con el preinóculo, y se creció el cultivo hasta fase logarítmica ($OD_{600}=0.6$). La inducción del promotor T7 se realizó añadiendo 0.5 mmol/L de IPTG, manteniendo el cultivo en las mismas condiciones de temperatura y agitación durante 16 h.

3.1.8.4. Aislamiento y purificación

Finalizado el tiempo de inducción, los cultivos se mantuvieron en hielo durante 10 min para detener el crecimiento celular. Se transfirieron a tubos de centrifuga

previamente pesados y se centrifugaron ($5000\times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) para recolectar las células bacterianas que contienen las proteínas en su citoplasma. Los pellets bacterianos se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

El pellet de bacterias se resuspendió en tampón de lisis (5 mL/g de células) junto con 0.1 mg/mL de lisozima, 4 $\mu\text{g/mL}$ de DNasa I e inhibidor de proteasas libre de EDTA.⁵⁰⁹ La suspensión de células se incubó con agitación (140 rpm) a temperatura ambiente durante 1 h. Para conseguir un mayor rendimiento en la lisis, se realizaron 10 ciclos de sonicación con pulsos de 10 s y una amplitud del 70%, manteniendo las células en hielo.

Para aislar los extractos de lisis, las suspensiones se centrifugaron a $15000\times g$, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se filtró (0.45 μm) para eliminar residuos del debris bacteriano. A continuación, los extractos se diluyeron con el tampón de unión (dilución 1:3) y se percolaron en una columna HisTrap FF crude de 1 mL, previamente equilibrada.

Para llevar a cabo la purificación, se empleó una bomba peristáltica manteniendo un caudal constante de aproximadamente 1 mL/min. Tras percolar la muestra, se lavó la columna con 30 mL de tampón de unión antes de eluir la proteína con 10 mL del tampón de elución. La proteína se recolectó en fracciones de 1 mL y alícuotas de las mismas se analizaron mediante SDS-PAGE.

Finalmente, se eliminó el imidazol mediante cromatografía de exclusión con columnas pre-empaquetadas PD-10 (Shephadex G-25), siguiendo las indicaciones del fabricante y usando PBS como buffer de equilibrado.

3.1.9. Caracterización molecular

3.1.9.1. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de las proteínas recombinantes purificadas se determinó espectrofotométricamente aplicando la ley de Lambert-Beer (13):

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (13)$$

donde A es la absorbancia de la disolución a una longitud de onda determinada, ε es el coeficiente de absorción molar, l es el paso óptico y c es la concentración. Las medidas se realizaron a 280 nm empleando un espectrofotómetro NANOdrop. Los coeficientes de

absorción molar a 280 nm se calcularon teóricamente, a partir de la secuencia de aminoácidos con la herramienta ExpASy ProtParam,⁵¹⁰ resultando ser 47330 M⁻¹cm⁻¹ para las construcciones que incluyen la FP mOrange2 y 33350 M⁻¹cm⁻¹ para las construcciones basadas en la EmGFP.

3.1.9.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los extractos proteicos presentes en las muestras, se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), según el método Laemmli.⁵¹¹

Las muestras se trataron durante 5 min a 98 °C en el tampón de aplicación. Posteriormente, tras la carga de las muestras, se llevó a cabo la electroforesis en el tampón de desarrollo durante, aproximadamente, 40 min a 25 mA/gel en un sistema Mini-Protean III (Bio-Rad) con geles de un espesor de 1 mm, un tamaño de 8 x 7.3 cm y con 15 pocillos. Se utilizaron marcadores de peso molecular para estimar el tamaño de las proteínas producidas.

3.1.9.3. Tinción con Coomassie

Tras la separación de las proteínas, los geles se tiñeron con azul de Coomassie durante 5–10 min. La visualización final del patrón proteico se obtuvo tras desteñir los geles en agitación con una solución de ácido acético al 7.5%.

3.1.9.4. Microbalanza de cristal de cuarzo

La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, del inglés *quartz cristal microbalance*) es un sensor piezoeléctrico, donde se miden las variaciones de la frecuencia de resonancia debidas a cambios de la densidad superficial de masa. Esta plataforma puede emplearse para detectar las interacciones Ag-Ab o de ligandos con proteínas. Concretamente, en la presente Tesis Doctoral se ha utilizado para caracterizar la interacción de las proteínas recombinantes con el FK506.

Las medidas se llevaron a cabo en la Università degli Studi di Firenze en colaboración con Giacomo Lucchesi del grupo de la Prof. Gabriella Caminati.

Para ello, se empleó una microbalanza QCM-Z500 (KSV Instruments Ltd.) equipada con módulo termoeléctrico (Oven Instrument). Se registraron los cambios en la frecuencia de resonancia (Δf) y en la energía de disipación (ΔD) de un sensor AT-cut5 MHz recubierto de oro (Nordtest s.r.l.), y con un área sensora de 0.785 cm^2 , a su frecuencia de resonancia (f_0) y al 3°, 5°, 7° y 9° sobretono. Los datos se analizaron con el software QCMBrowser 2.30 (KSV Instrument Ltd).

Dado que las proteínas recombinantes contienen una cola de histidinas, se empleó una superficie modificada con NTA-Ni para la inmovilización orientada de las mismas.⁵¹² En primer lugar, la superficie sensora recubierta de oro se lavó con ácido crómico, se aclaró con agua y se secó con corriente de nitrógeno. A continuación se formó la monocapa autoensamblada (SAM) con una disolución de 3,3'-ditiobis[*N*-(5-amino-5-carboxipentil)propionamida-*N,N'*-diácido acético (C2-NTA) (0.1 mmol/L) y se formó el complejo con $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.5 mmol/L).

La funcionalización de la superficie NTA-Ni con las proteínas fluorescentes se llevó a cabo empleando una disolución de 500 nmol/L de la proteína en PBS hasta saturar la superficie.

Finalmente se midió la interacción del FK506 con la proteína inmovilizada, añadiendo de manera secuencial alícuotas del analito en PBS en el intervalo de concentraciones de 1 pmol/L – 10 nmol/L.

La masa (m) detectada para las capas de proteínas adsorbidas se estimó utilizando la ecuación de Sauerbrey⁵¹³ (14) y el modelo Voigt⁵¹⁴ incluidos en el software del instrumento, QCMBrowser 2.30 (KSV Instrument Ltd, Finland):

$$\Delta f = -\frac{2nf_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}\Delta m \quad (14)$$

donde n es el número del sobretono, ρ_q y μ_q son la densidad y el módulo de cizalladura del cristal de cuarzo, respectivamente.

La masa detectada de la película rígida con una disipación de energía pequeña o nula se calculó con la ecuación Sauerbrey, mientras que el modelo de Voigt se aplicó en el caso de valores de disipación mayores correspondientes a las capas blandas y elásticas.⁵¹⁵

La densidad de masa superficial de saturación $(\Delta m/A)_{sat}$ y el área molecular relativa ocupada en la superficie (\bar{A}) se calculó empleando la Ecuación 15:

$$\bar{A} = \frac{MW}{\left(\frac{\Delta m}{A}\right)_{sat} \cdot N_A} \quad (15)$$

donde MW es la masa molecular y N_A es el número de avogadro.

El grosor de la capa adsorbida se determinó a partir del análisis detallado de todos los sobretonos para la configuración QCM-Z utilizando el software QCMBrowse y mediante una estimación simple del grosor de la capa usando una densidad media de las proteínas obtenidas a partir del ajuste de los datos. Los datos se analizaron con el software Igor 6.10A (Wavemetrics, USA).

El cálculo de los parámetros cinéticos se realizó con un modelo de unión simple de Langmuir (16):

$$\frac{\Delta m}{A} = \frac{\left(\frac{\Delta m}{A}\right)_{sat} [FK506]}{k'_d + [FK506]} \quad (16)$$

donde k'_d es la pseudo constante de unión del FK506 a las proteínas de fusión que contienen la FKBP1A.

3.2. Aplicación de las proteínas de fusión fluorescentes al desarrollo de bioensayos empleando partículas magnéticas

3.2.1. Reactivos

- *N*-hidroxisulfosuccinimida (sNHS, Fluorochem).
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Fluorochem).
- Dimetil sulfóxido anhidro (DMSO, VWR).
- Agua Milli-Q (MilliPore).
- Metanol (MeOH, Thermo Fisher Scientific).
- IgM monoclonal de ratón anti-FK506 (Santa Cruz Biotechnology).
- IgG policlonal de burro anti-IgM de ratón marcado con Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch).
- Ácido micofenólico (MPA, Alfa Aesar).
- Tacrolimus (FK506, Sinoway Industrial).
- Sirolimus (Sir, Fisher BioReagents).
- Derivado carboxilado del tacrolimus (FK506-COOH). Sintetizado en el grupo de investigación GSOLFA en el marco de la Tesis Doctoral de Francesca Salis.³³⁶

Las disoluciones stock de los haptenos se prepararon en DMSO a concentraciones superiores a 1 mg/mL y se conservaron a 4 °C. Las disoluciones de calibrado de los diferentes analitos se prepararon diariamente diluyendo con PBST (10 mmol/L, pH 7.4).

3.2.2. Disoluciones y agentes bloqueantes

- Tampón fosfato sódico salino (PBS, Sigma): 10 mmol/L fosfato, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, pH 7.5.
- Tampón ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES): 50 mmol/L HEPES, 100 mmol/L NaCl, pH 8.
- Tampón tris(hidroximetil)aminometano (Tris, Bio-Rad): 50 mmol/L Tris, pH 8.
- Tampón PBST: PBS conteniendo T20 al 0.1% (v/v).
- Tampón ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfónico (MES, Thermo Fisher): 100 mmol/L MES, 0.9% NaCl, pH 4.7.
- Tampón de bloqueo de caseína en PBS (Thermo Fisher Scientific).

- Tampón de bloqueo libre de proteínas en PBS Pierce[®] (PFBB, del inglés *protein free blocking buffer*): PBS pH 7.4, agente antimicrobiano kathon y un compuesto protegido bajo patente.

3.2.3. Instrumentación

- Para los bioensayos, se usó un lector de microplacas, BMG LABTECH CLARIOstar, en el modo fluorescencia. Se empleó una λ_{exc} de 475 ± 10 nm y una λ_{em} de 520 ± 10 nm.
- Centrífuga miniSpin (Eppendorf AG).
- Savant DNA SpeedVac 110 (Holbrook, USA).
- Lavador de placas HydroFlex[™] con soporte magnético (Tecan).
- Balanza analítica Mettler AT261 DeltaRange[®] con 0.01 mg de sensibilidad.
- Sonda de ultrasonidos (P-Selecta, España).
- pH-metro Crison GLP 21.
- Agitador vortex (Bio-vortex, España).
- Material analítico de calidad contrastada.
- Placas multipocillo negras de 96 pocillos (Thermo Fisher).
- Tubos de polipropileno cónicos de 15 y 50 mL (Thermo Fisher).
- Partículas magnéticas aminadas Dynabeads M-270 (Invitrogen).
- Programa de tratamiento y procesado de datos OriginPro 2016, Microsoft Excel 2016 y MARS (BMG labtech).

3.2.4. Aplicación de las proteínas de fusión fluorescentes al desarrollo de bioensayos empleando partículas magnéticas

3.2.4.1. Inmovilización del FK506 sobre la superficie de partículas magnéticas

La funcionalización de la superficie de partículas magnéticas aminadas, se realizó a través de la formación de enlaces amida con grupos carboxílicos activados con carbodiimida.³⁸⁶ Se empleó un derivado carboxilado del FK506 (FK506-COOH) para la funcionalización.⁵¹⁶

Antes de recubrir las partículas con el hapteno, es necesario realizar un lavado de la superficie. Para ello, la disolución de partículas se homogeneizó agitándose durante al

menos 10 min. A continuación, se transfirieron 2 mg de las partículas magnéticas a un tubo, y se lavaron tres veces con 500 μ L de tampón MES (0.1 mol/L, pH 4.7), capturando las partículas con ayuda de un imán.

Una vez limpias, las partículas se resuspendieron en 858 μ L de tampón MES y sobre la suspensión se añadieron 70.2 μ L de FK506-COOH (11.4 mmol/L), 24.7 μ L de EDC (677.2 mmol/L) y 46.7 μ L de sNHS (1415 mmol/L). Tras una incubación de 18 h con agitación (1000 rpm) a temperatura ambiente, las partículas se lavaron tres veces con 500 μ L de tampón MES y dos veces con 500 μ L de tampón PBST. Finalmente, se resuspendieron en 400 μ L de tampón de PBST para una concentración final de 5 mg/mL. Las partículas funcionalizadas (MB-FK506) se conservaron a 4 °C, hasta su uso.

Para comprobar que las MB estaban activadas con el hapteno, se realizaron inmunoensayos de tipo competitivo utilizando como elemento de reconocimiento un anticuerpo monoclonal IgM anti-FK506. Para ello, en una placa de 96 pocillos se añadieron 6.5 μ g de las MB-FK506 por pocillo y se incubaron con 200 μ L de IgM anti-FK506 (5 μ g/mL en PBST) durante 30 min con agitación. Los pocillos se lavaron con un lavador de placas para eliminar los Ab no unidos a las partículas. La detección se realizó añadiendo 200 μ L/pocillo de un Ab IgG anti-IgM marcado con AlexaFluor 647 (5 μ g/mL en PBST) e incubando 30 min con agitación. Una vez lavadas las partículas, se resuspendieron en 50 μ L de PBST/pocillo y se midió la emisión del AlexaFluor 647 con un lector de placas ($\lambda_{exc} = 625 - 30$ nm, $\lambda_{em} = 680 - 30$ nm).

3.2.4.2. Protocolo de ensayo empleando MB-FK506 y las proteínas FKBP1A-FP

Los ensayos de medida se basan en un formato de tipo competitivo (o inhibición) para la detección de FK506. En el, el derivado de tacrolimus FK506-COOH, inmovilizado en la superficie de las MB, compite con el analito libre en disolución por el sitio de reconocimiento de las proteínas recombinantes FKBP1A-FP.

Para ello, 180 μ L de las disoluciones estándar en PBST se mezclaron con 20 μ L de la proteína fluorescente (52.5 μ g/mL) en una placa multipocillo. Tras una incubación de 25 min con agitación suave a 18 °C, se añadieron a la disolución 10 μ L de MB-FK506 (5 μ g/mL). La mezcla se incubó 15 min con agitación suave a 18 °C, eliminándose el

exceso de reactivos con 3x PBST en un lavador de placas con soporte magnético. Las medidas se realizaron añadiendo 50 μ L/pocillo de PBST.

En la **Figura 43** se muestra un esquema del protocolo de ensayo. Las medidas se realizaron resuspendiendo las partículas en 50 μ L de PBST y la adquisición de la señal de fluorescencia se realizó tras agitar la placa durante 30 s a 500 rpm. El promedio de 15 señales de fluorescencia independientes obtenidas de cada pocillo, se normalizó frente a los niveles de señal máximos y mínimos. Los puntos experimentales se ajustaron a una ecuación logística sigmoideal de cuatro parámetros (apartado 3.4 del Capítulo IV).

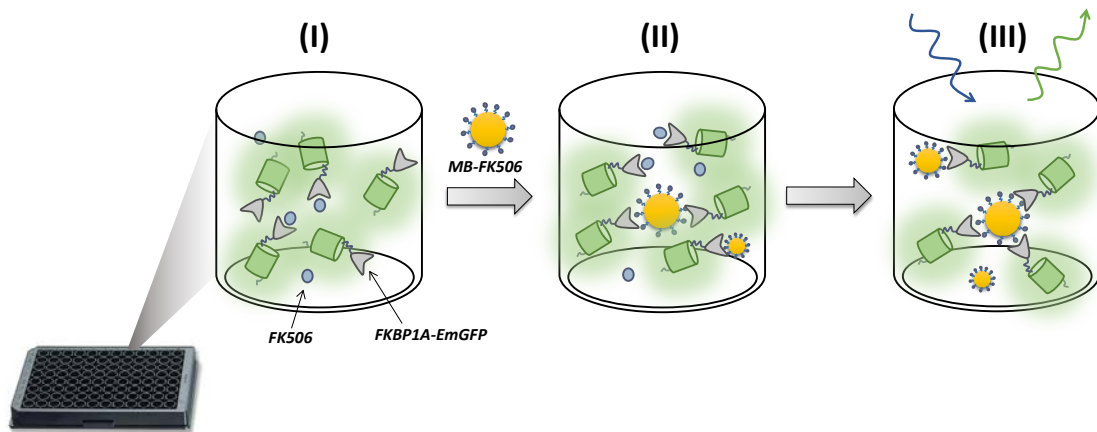


Figura 43. Esquema del protocolo de ensayo para la detección de tacrolimus. En una primera etapa (I), el FK506 es reconocido por la proteína recombinante FKBP1A-EmGFP. En una siguiente etapa (II), se emplean partículas magnéticas funcionalizadas con FK506 (MB-FK506) para capturar la proteína libre FKBP1A-EmGFP. Finalmente (III), después de una etapa de lavado se mide la intensidad de la fluorescencia de la proteína FKBP1A-EmGFP capturada por las MB-FK506. Cuanto mayor sea la concentración de analito en la muestra, menor será el número de proteínas capturadas y en consecuencia la señal de fluorescencia medida.

La reactividad cruzada (CR) frente a otros inmunosupresores, se determinó calculando el IC_{50} a partir de las curvas de calibrado de los respectivos bioensayos. Los valores de CR se calcularon de acuerdo a la Ecuación 17:

$$CR(\%) = \frac{IC_{50}^{FK506}}{IC_{50}^{\text{reactivo cruzado}}} \times 100 \quad (17)$$

3.2.4.3. Análisis de muestras reales

Las muestras de sangre entera fueron donadas por pacientes en tratamiento con FK506 y voluntarios sanos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Las muestras fueron recogidas con permiso del comité de ética de dicho Hospital (no. PI 21-2245). La recolección de la sangre venosa fue realizada en tubos EDTA y se transportaron y almacenaron a una temperatura inferior a -15 °C. Los análisis se llevaron a cabo durante los 5 meses posteriores a su recolección.

La extracción y purificación del FK506 de las muestras de sangre entera se realizó mediante la precipitación de proteínas con MeOH, a partir de la modificación de métodos ya descritos en la bibliografía.⁵¹⁷ Para ello, 600 µL de la muestra se mezclaron con 600 µL de metanol, se le aplicaron tres ciclos de sonicación de 5 segundos y la mezcla se centrifugó durante 30 min a 12100 g. El sobrenadante obtenido se evaporó hasta sequedad con ayuda del evaporador Savant DNA SpeedVac 110. El residuo obtenido se resuspendió en 30 µL de PBS con un 1% de T20 y se sometió a un nuevo ciclo de sonicación durante 5 min. Las muestras reconstituidas se centrifugaron (5 min, 12100 g) y el sobrenadante se diluyó con PBS hasta un volumen final de 600 µL.

La concentración de FK506 presente en las muestras sanguíneas fue determinado mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.2.4.2. de esta sección y los resultados se validaron con los obtenidos mediante el ensayo comercial ARCHITECT iSystem (Abbot). Estas medidas fueron realizadas en un laboratorio externo siguiendo las instrucciones de fabricante.

3.3. Aplicación de las proteínas de fusión fluorescentes al desarrollo de bioensayos empleando micromotores

3.3.1. Reactivos

- *N*-hidroxisulfosuccinimida (sNHS, Fluorochem).
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Fluorochem).
- Dimetil sulfóxido anhidro (DMSO, VWR).
- Diclorometano (Thermo Fisher).
- Isopropanol (Scharlau).
- Etanol (Scharlau).
- Ácido 3-aminofenilborónico (APBA, Acros Organics).
- Sulfato sódico (Sigma Aldrich).
- Ácido clorhídrico (Sigma Aldrich).
- Carbono mesoporoso (CB, Sigma Aldrich).
- Ácido clorplatínico (Sigma Aldrich).
- Ácido bórico (Fluka).
- Grafeno oxidado (GO, Sigma Aldrich).
- Sulfamato de níquel (Sigma Aldrich).
- Cloruro de níquel (Sigma Aldrich).
- Policaprolactona, MW~14,000 (PCL, Sigma Aldrich).
- Dodecil sulfato de sodio (SDS, Fluka).
- Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro de 10 nm (Sigma Aldrich).
- Cloroformo (Merck).
- Etilendiamina (EDA, Alfa Aesar).
- Peróxido de hidrógeno (Thermo Fisher).
- Agua Milli-Q (MilliPore).
- Tacrolimus (FK506, Sinoway Industrial).
- Derivado carboxilado del tacrolimus (FK506-COOH). Sintetizado en el grupo de investigación GSOLFA en el marco de la Tesis Doctoral de Francesca Salis.³³⁶
- Ácido micofenólico (MPA, Alfa Aesar).

Las disoluciones stock de los haptenos se prepararon en DMSO con unas concentraciones mayores de 1 mg/mL y se conservaron a 4°C. Las disoluciones de calibrado de los diferentes analitos se prepararon diariamente por diluir las disoluciones patrón con PBST (10 mmol/L, pH 7.4).

3.3.2. Disoluciones y agentes bloqueantes

- Tampón fosfato sódico salino (PBS, Sigma): 10 mmol/L fosfato, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, pH 7.5.
- Tampón PBST: PBS conteniendo T20 al 0.1% (v/v).
- Tampón ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfónico (MES, Thermo Fisher): 100 mmol/L MES, 0.9% NaCl, pH 4.7.

3.3.3. Instrumentación

- Microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse), acoplado con diferentes objetivos (10×, 20× y 40×), filtros de corte (λ_{ex} , 480/30 nm; λ_{em} , 535/45 nm), una cámara digital Hamamatsu C11440 y el software NIS Elements AR 3.2, para capturar imágenes y películas a una velocidad de 30 fotogramas/s. Como fuente de luz se emplea un sistema CoolLED pE-4000. La velocidad de los micromotores se monitoriza empleando un módulo de seguimiento de NIS Elements.
- Centrífuga miniSpin (Eppendorf AG).
- Sonda de ultrasonidos (P-Selecta, España).
- pH-metro Crison GLP 21.
- Agitador vortex (Bio-vortex, España).
- Material analítico de calidad contrastada.
- Placas multipocillo negras de 96 pocillos (Thermo Fisher).
- Membranas de policarbonato con poro cónico de 5 μ m (Whatman).
- Potenciostato Autolab PGSTAT 12 (Eco Chemie).
- Programa de tratamiento y procesado de datos OriginPro 2016 y Microsoft Excel 2016.

3.3.4. Síntesis de micromotores Janus

Para el desarrollo del ensayo se sintetizaron micromotores de policaprolactona (PCL). Este material se ha empleado anteriormente como vehículo de solubilización del FK506 en forma de micelas.⁵¹⁸

La síntesis de los micromotores Janus de PCL junto con nanopartículas magnéticas (NPs) de óxido de hierro se llevó a cabo empleando la aproximación de la emulsión de “aceite en agua”.⁵¹⁹ Para ello, en una primera etapa, se prepararon 500 μL de una disolución de PCL en cloroformo (100 mg/mL) y se mezclaron con 500 μL de la dispersión comercial de las NPs magnéticas en tolueno. A continuación, la mezcla se añadió lentamente sobre 4.5 mL de una disolución de SDS (11.1 mg/mL) con agitación magnética. Tras 10 min de agitación, se observó la formación de gotas de la emulsión que contienen el polímero y las NPs. La emulsión se depositó sobre una placa Petri de vidrio para facilitar la evaporación de los disolventes orgánicos y la solidificación del polímero. Durante esta etapa, las NPs tienden a acumularse en la superficie de las gotas, para reducir la energía interfacial, dando lugar a una acumulación asimétrica de las NPs que confiere a los micromotores una propulsión y direccionalidad más eficiente. Transcurridas 16 h, los micromotores se resuspendieron en agua milli-Q y se lavaron con agua milli-Q hasta eliminar el SDS.

Para unir covalentemente al FK506-COOH sobre la superficie de los micromotores Janus, se llevó a cabo su aminación empleando un protocolo modificado descrito en literatura.^{520,521} Para ello, $1.26 \cdot 10^6$ micromotores se suspendieron en 2 mL de una disolución de etilendiamina (EDA, 375 mmol/L) y se incubaron con agitación a 37 °C durante 30 min. Pasado este tiempo, los micromotores se lavaron tres veces con agua milli-Q y otras tres veces con tampón MES. Seguidamente se resuspendieron en 429 μL de tampón MES (0.1 mol/L, pH 4.7) añadiéndose 35.1 μL de FK506-COOH (10 mg/mL), 12.37 μL de EDC (105.2 mg/mL) y 23.34 μL de sNHS (163 mg/mL). Tras una incubación de 16 h con agitación a temperatura ambiente, las partículas se lavaron tres veces con 500 μL de tampón MES y dos veces con 500 μL de tampón PBS, resuspendiéndose en un volumen final de 500 μL de tampón PBS. Los micromotores funcionalizados se conservan a 4 °C hasta su uso.

3.3.5. Protocolo de ensayo empleando las partículas Janus y las proteínas FKBP1A-FP

Para la realización del ensayo, 3 μL de las disoluciones estándar del inmunosupresor preparadas en PBS se mezclaron con 30 μL de la proteína recombinante fluorescente (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en una placa multipocillo. A continuación, se añadieron a la disolución 30 μL de una disolución de micromotores ($1.26 \cdot 10^6$ micromotores/ mL) y, tras una incubación de 15 min con agitación magnética, se midió la fluorescencia de 1 μL de la disolución en el microscopio óptico invertido. También se midió un blanco utilizando PBS como muestra. En la **Figura 44** se muestra un esquema del protocolo de ensayo.

Los datos de fluorescencia obtenidos se representaron como la relación B/B_0 (siendo B y B_0 las señales de fluorescencia en presencia y ausencia de FK506 respectivamente), frente al logaritmo de la concentración del analito como se describió en el apartado 3.4 del Capítulo IV. La CR frente a otros inmunosupresores se determinó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.4.2

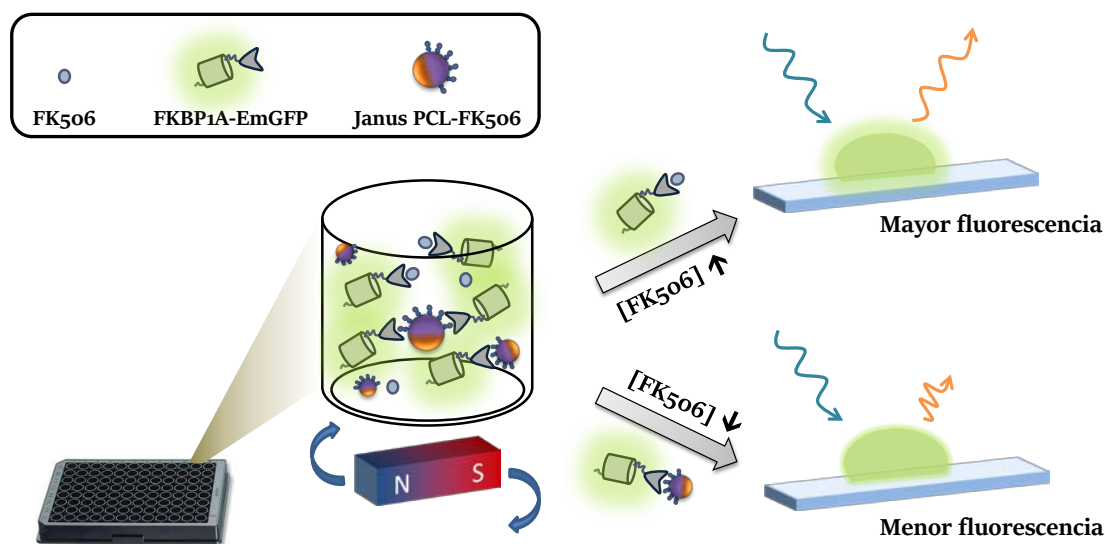


Figura 44. Esquema del protocolo de ensayo para la detección de FK506 empleando micromotores. La cuantificación del inmunosupresor se realiza empleando un ensayo competitivo, en el que el analito y el analito inmovilizado en los micromotores (PCL-FK506) compiten por el sitio de reconocimiento del receptor selectivo fluorescente (FKBP1A-EmGFP). Al aumentar la concentración de analito en la muestra, aumenta la concentración de FKBP1A-EmGFP en disolución, y con ello la fluorescencia del medio. Al disminuir la concentración de FK506 en la muestra, aumenta la cantidad de proteína fluorescente que interacciona con el FK506 inmovilizado en los micromotores, disminuyendo la fluorescencia de la disolución.

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis y expresión de proteínas fluorescentes

4.1.1. Producción de proteínas recombinantes de FKBP1A fusionadas a proteínas fluorescentes

4.1.1.1. Clonación y secuenciación de las construcciones

Las clonaciones del gen *FKBP1A* en el vector de expresión pQE-T7-2 junto con las secuencias codificantes de las proteínas fluorescentes EmGFP y mOrange2, se realizó de forma que entre las dos proteínas fusionadas existiera una cadena espaciadora formada por glicinas y serinas (GGGS). También se añadió en el extremo N-terminal una cola de histidinas (HisTag) para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad.

En primer lugar, el plásmido de expresión y las plantillas génicas se amplificaron mediante PCR con cebadores que añadieron zonas de solapamiento para la formación de las construcciones. A continuación, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR para comprobar que el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos se ajustaban al tamaño esperado (**Figura 45**).

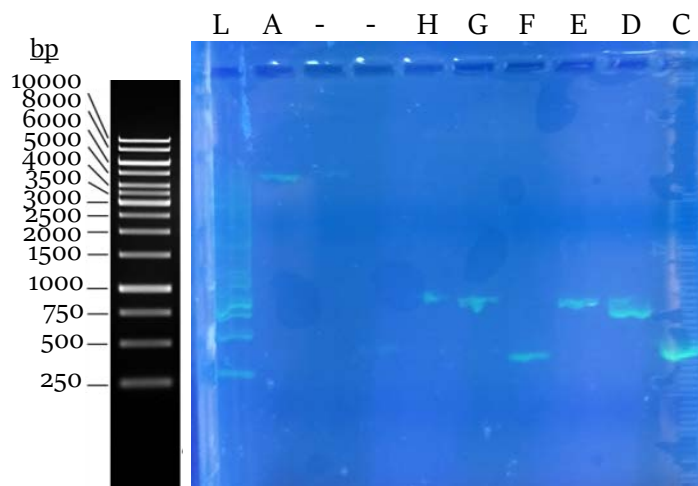


Figura 45. Análisis electroforético en gel de agarosa (1%) para determinar la presencia de los amplicones generados mediante PCR. L: marcador de peso molecular. A-H: amplicones obtenidos mediante PCR según la pareja de cebadores empleados y la plantilla génica (Tabla 15).

Tras el ensamblaje de los fragmentos, se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* DH5-alfa, seleccionándose tres clones individuales de cada construcción en placas de LB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina. Los plásmidos

se perpetuaron y purificaron según se describe en los Materiales y Métodos (apartado 3.1.8.1 de esta sección). Finalmente, la secuencia de cada una de las construcciones preparadas se comparó con la teórica, observándose una buena concordancia entre ellas.

4.1.1.2. Expresión de las proteínas recombinantes fluorescentes FKBP1A-FP en *E. coli*

Con el fin de obtener transformantes, se transformaron individualmente cepas de *E. coli* BL21 (DE3) con los vectores de expresión preparados en el apartado 3.1.8.1. (pFKBP1A-mOrange2, pmOrange2-FKBP1A, pFKBP1A-EmGFP, pEmGFP-FKBP1A).

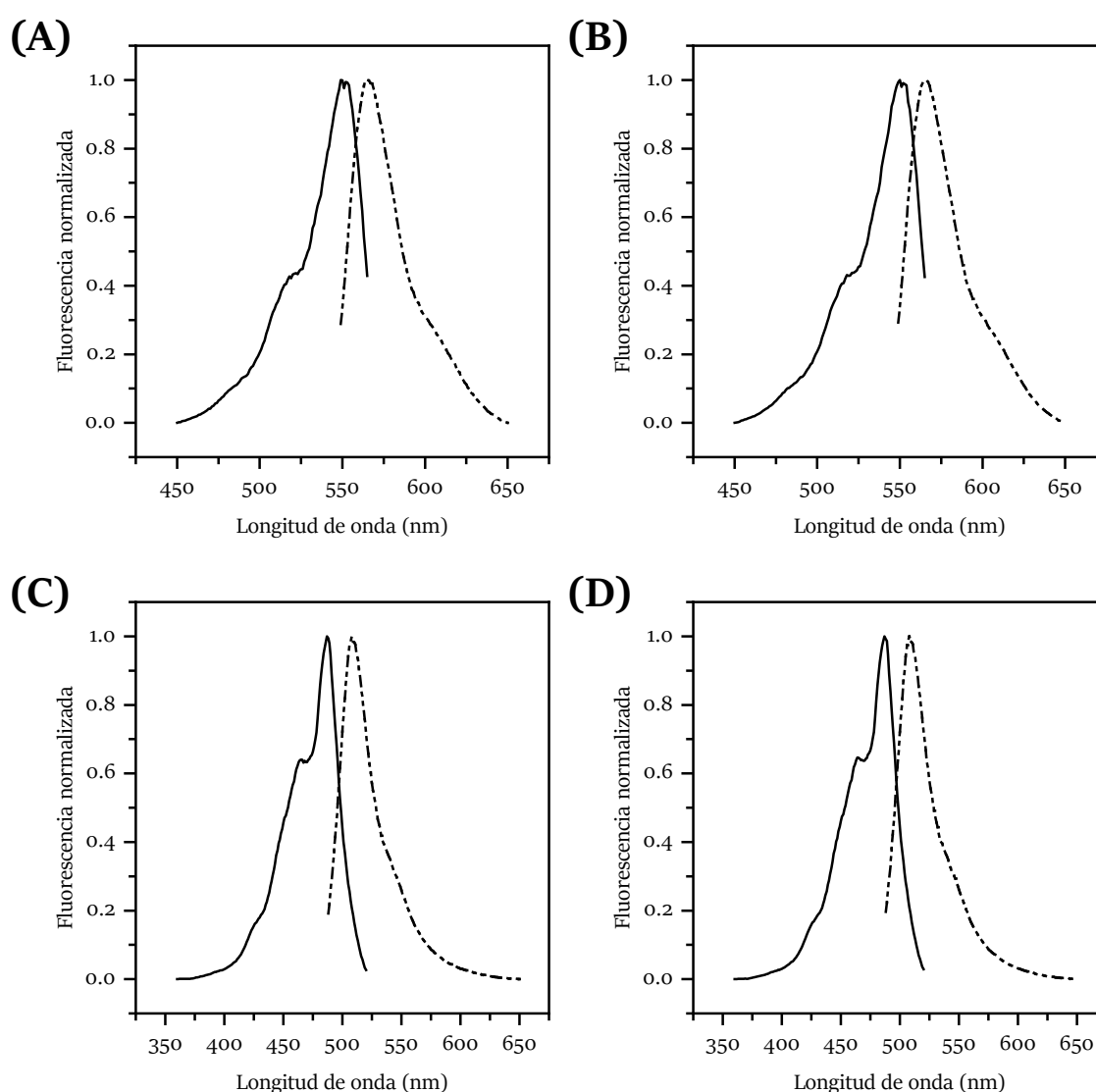


Figura 46. Espectros de fluorescencia normalizados (— excitación; · - · emisión) de los cultivos bacterianos tras 16 h de inducción de la expresión de las proteínas con IPTG (0.5 mmol/L). (A) FKBP1A-mOrange2, (B) mOrange2-FKBP1A, (C) FKBP1A-EmGFP, (D) EmGFP-FKBP1A.

Para evaluar la capacidad de producción de las proteínas de interés tras la transformación con los plásmidos preparados, se siguió el procedimiento experimental descrito en el apartado 3.1.8.3. Tras 16 h de crecimiento desde la inducción, se centrifugaron alíquotas (200 μ L) de los cultivos y se resuspendieron en el mismo volumen de PBS. Se transfirieron 100 μ L a una placa multipocillo y se midió la fluorescencia en un lector de placas. En la **Figura 46** se muestran los espectros de excitación y emisión obtenidos para las cuatro proteínas recombinantes fluorescentes fusionadas al receptor FKBP1A.

Una vez seleccionado el tiempo adecuado de expresión, se llevó a cabo la inducción de las proteínas a mayor escala que, tras el lisado, se purificaron mediante cromatografía de afinidad empleando una columna “HisTrap FF crude” acoplada a una bomba peristáltica. Este tipo de columna contiene un sorbente de Ni-agarosa que permite purificar proteínas recombinantes marcadas con una cola de polihistidina.

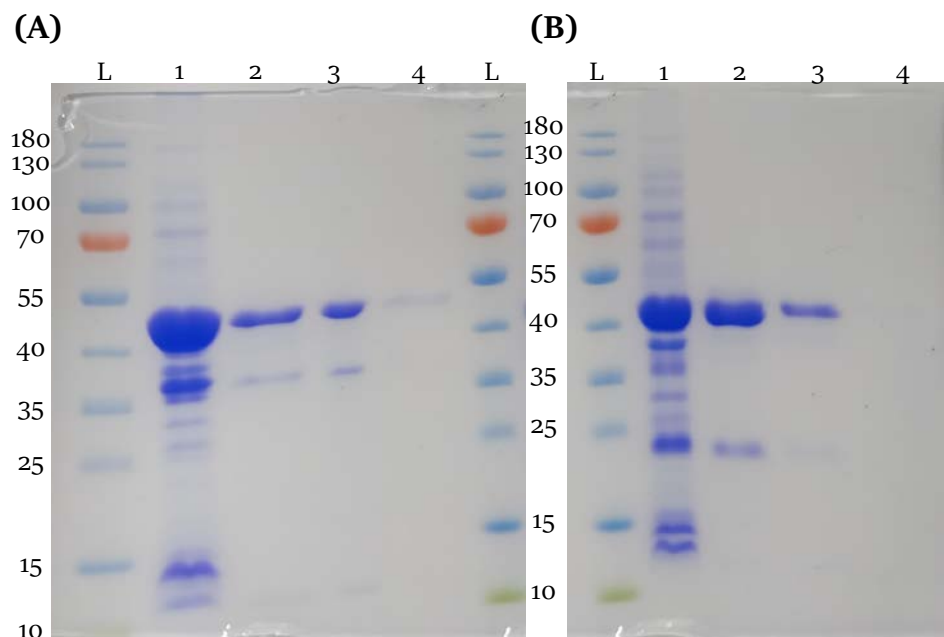


Figura 47. Análisis electroforético de ciertas fracciones obtenidas en la purificación mediante cromatografía de afinidad para las proteínas **(A)** mOrange2-FKBP1A y **(B)** FKBP1A-mOrange2. L: marcador de peso molecular; 1: extracto de lisis antes de la purificación; 2-4: fracciones de elución 2-4 en la purificación de las proteínas.

Las alícuotas coloreadas de las fracciones de purificación recogidas de la columna se visualizaron en geles de acrilamida SDS-PAGE, mostrando una gran banda de aproximadamente 41 kDa que coincide con el tamaño esperado de las proteínas de fusión.

A modo de ejemplo, en la **Figura 47** se presentan los resultados obtenidos para las proteínas recombinantes que contienen la mOrange2.

4.1.2. Caracterización de las proteínas recombinantes fluorescentes

4.1.2.1. Caracterización espectroscópica

La caracterización de las proteínas de fusión se realizó mediante espectroscopia de absorción y de emisión. En la **Figura 48** se muestran los espectros de absorción y emisión, en PBS, de las diferentes construcciones expresadas. Los espectros de absorción y emisión obtenidos para las proteínas recombinantes presentan máximos similares a los correspondientes a las proteínas fluorescentes nativas, lo que indicaría que la fusión con la FKBP1A no afecta a su estructura ni a la formación del cromóforo.

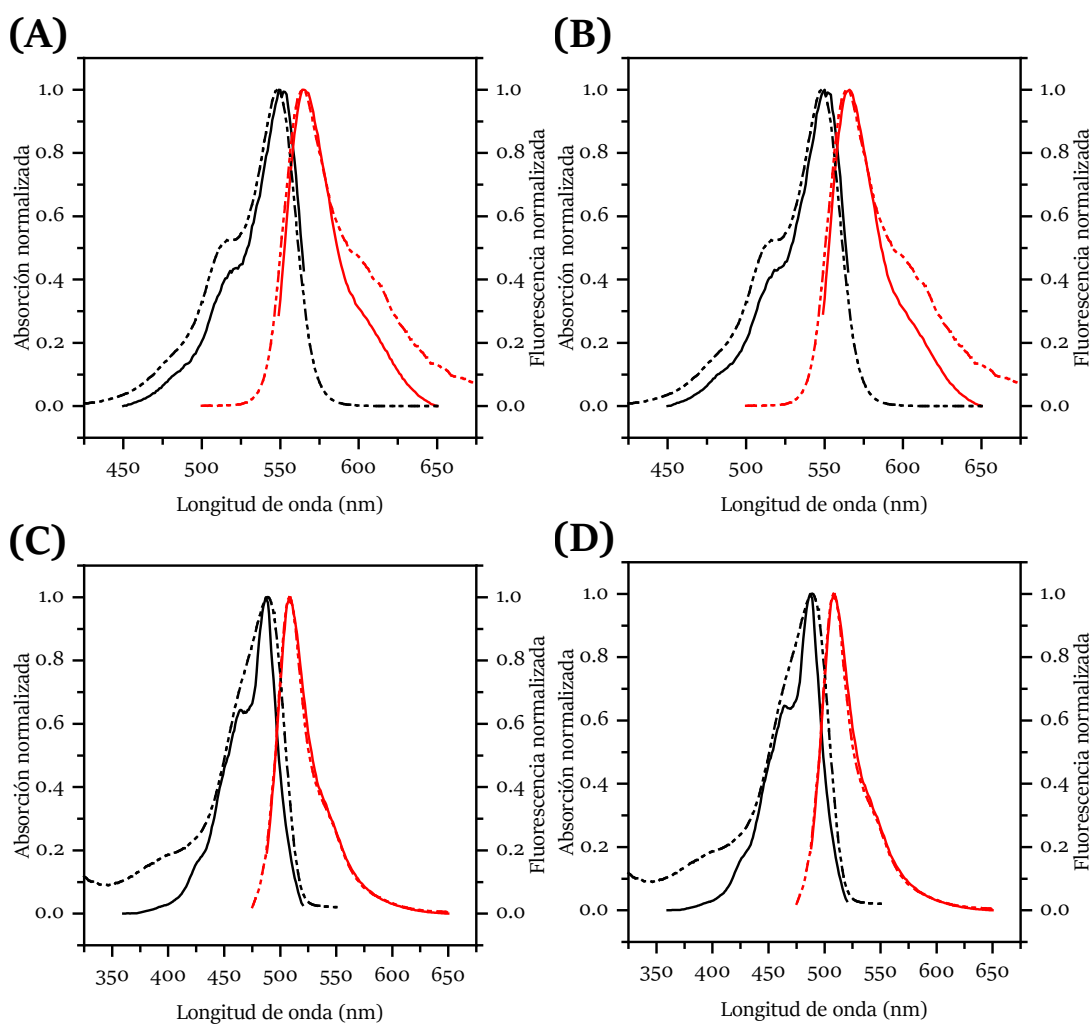


Figura 48. Espectros normalizados de absorción (línea negra sólida) y emisión (línea roja sólida) para las proteínas recombinantes en PBS. **(A)** FKBP1A-mOrange2, **(B)** mOrange2-FKBP1A, **(C)** FKBP1A-EmGFP, **(D)** EmGFP-FKBP1A, en PBS. Las líneas punteadas muestran los espectros normalizados correspondientes a las proteínas fluorescentes nativas.

4.1.2.2. Análisis mediante microbalanza de cristal de cuarzo

La caracterización de la unión del FK506 con las proteínas recombinantes fluorescentes se realizó empleando la QCM. Las medidas se llevaron a cabo en la Università degli Studi di Firenze en colaboración con Giacomo Lucchesi y la Prof. Gabriella Caminati. Para ello, cada una de las proteínas recombinantes fluorescentes se inmovilizó sobre la superficie de oro del sensor siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.9.4 de los Materiales y Métodos.

La formación de la SAM funcionalizada con el complejo Ni-NTA ($C_2NTA-Ni^{2+}$) se monitorizó empleando la microbalanza. Como puede observarse en la **Figura 49**, a medida que se forma la monocapa se produce un descenso paulatino de la frecuencia de resonancia y un aumento de la disipación de la energía. Este comportamiento podría justificarse por el proceso de quimisorción de las moléculas implicadas en la formación de la monocapa, así como por la formación de una película rígida fina sobre la superficie. En la **Tabla 16** se muestran los principales parámetros estructurales obtenidos para la formación de la SAM, los cuales están de acuerdo con los resultados obtenidos en trabajos anteriores donde se obtuvieron densidades de masa superficial de 95 ng/cm^2 y espesores de una película rígida de 16 \AA .^{512,522}

Tabla 16. Principales parámetros obtenidos de la adsorción del ditiobis(C_2NTA) sobre los sensores QCM.

	Ditiobis($C_2NTA-Ni^{2+}$)
Densidad de masa superficial (ng/cm^2)	139 ± 20
Masa adsorbida (ng)	109 ± 16
Área molecular promedio (\AA^2)	90 ± 22
$\Delta D_3/3 \cdot 10^{-6}$	0.2 ± 0.3
Espesor (\AA)	16 ± 1
Relación $Ni^{2+}/\text{ditiobis}(C_2NTA)$	1.15 ± 0.31

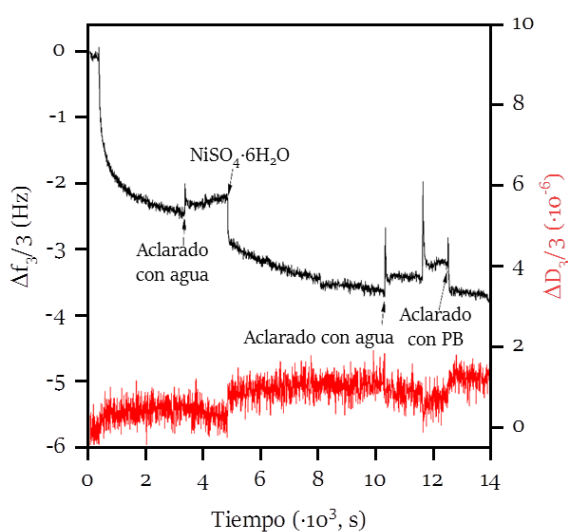


Figura 49. Desplazamientos de la frecuencia normalizada ($\Delta f_3/3$) (líneas negras) y variaciones de la energía de disipación ($\Delta D_3/3$) (líneas rojas), durante la adición de C₂NTA a la superficie de oro del sensor y su posterior complejación con Ni²⁺.

La inmovilización de las proteínas de fusión sobre la superficie sensora modificada se monitorizó hasta que no se detectaron cambios en la frecuencia de resonancia. A modo de ejemplo, en la **Figura 50B**, se muestra la respuesta típica del desplazamiento de la frecuencia de resonancia ($\Delta f_3/3$) y la variación de la disipación de energía del tercer armónico ($\Delta D_3/3$) obtenidas para la proteína HisTag-mOrange2-FKBP1A, siendo un perfil común para todas las proteínas medidas.

Además, se observó una disminución del desplazamiento de frecuencia, la cual se correlaciona con un aumento de la masa adsorbida en la superficie del sensor debida a la adsorción de la proteína en la capa de ditiobis(C₂NTA-Ni²⁺) a través de la cola de histidinas.⁵²³ Por otro lado, el ligero aumento de ΔD_3 ($0.5 \cdot 10^{-6}$) muestra que la adsorción de la proteína no afecta de manera significativa a las propiedades viscoelásticas de la capa SAM. Esto sugiere que la capa de proteínas formada en la superficie es compacta y rígida.

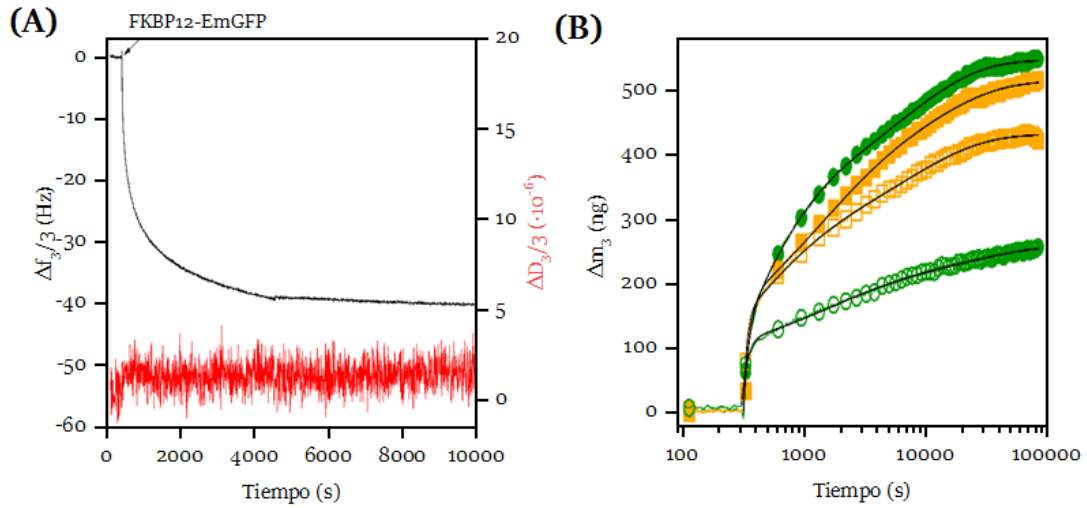


Figura 50. (A) Desplazamientos de la frecuencia normalizada ($\Delta f_3/3$) (líneas negras) y variaciones de la energía de disipación ($\Delta D_3/3$) (líneas rojas), durante la adsorción de la proteína FKBP1A-EmGFP. (B) Ajuste con la función multi-exponencial de la variación de la masa adsorbida para cada proteína estudiada en función del tiempo transcurrido desde la inyección en la cámara de medición.

Las cuatro proteínas de fusión estudiadas tardaron aproximadamente 2.5 h en adsorberse completamente. Sin embargo, la cinética de adsorción no siguió una dependencia mono-exponencial con el tiempo, como cabría esperar en una adsorción simple de Langmuir. La presencia de varios regímenes cinéticos en la adsorción de proteínas ha sido descrito anteriormente,⁵²⁴ y puede emplearse una función multi-exponencial (18) para su ajuste:

$$\Delta m = y_0 + A_1 e^{-\frac{x-x_0}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{x-x_0}{\tau_2}} + A_3 e^{-\frac{x-x_0}{\tau_3}} \quad (18)$$

donde y_0 es el valor de saturación; x_0 es el desplazamiento de x ; A_1 , A_2 y A_3 son la amplitud; y τ_1 , τ_2 y τ_3 son las constantes de tiempo expresadas en segundos.

En la **Tabla 17** se muestran los parámetros del ajuste y aquellos obtenidos a partir de los datos experimentales correspondientes al equilibrio.

La primera etapa es similar para las cuatro proteínas recombinantes, donde la proteína se une al $C_2NTA-Ni^{2+}$ con una conformación plana que ocupa una gran superficie. A medida que la adsorción avanza, comienza una segunda etapa, más lenta, en la que las proteínas comienzan a tener una conformación con cierta inclinación, dando lugar a un empaquetamiento más denso y permitiendo la unión de más proteínas a la

superficie hasta saturar los sitios de unión. Por último, se produce una reorganización más lenta de las dos subunidades proteicas que permite alcanzar la máxima densidad de empaquetamiento.

Tabla 17. Resumen de los principales parámetros obtenidos a partir de los datos QCM de la adsorción de las proteínas recombinantes fluorescentes fusionadas a FKBP1A sobre las superficies sensoras modificadas con C₂NTA-Ni²⁺.

	HisTag- EmGFP- FKBP1A	HisTag- FKBP1A- EmGFP	HisTag- mOrange2- FKBP1A	HisTag- FKBP1A- mOrange2
Constantes de la cinética de adsorción				
τ_1 (s)	15.639	13.569	9.484	16.919
τ_2 (s)	529.06	168.71	197.24	425.97
τ_3 (s)	3433.8	1539	1608.9	1954.2
Parámetros obtenidos				
Densidad de masa superficial (ng/cm ²)	349	677	563	648.4
$\Delta D_3/3 \cdot 10^{-6}$	0.1	1.0	0.4	0.4
Incremento del espesor (Å)	39	66	54	61
Área molecular promedio (Å ²)	1934	997	1196	1039
Ratio ditiobis(C ₂ NTA)/Proteína	13	10	11	10

Por otro lado, las densidades de masa superficial varían según la proteína recombinante empleada y, dado que el peso molecular de todas ellas es similar, la diferencia observada en el caso de la HisTag-EmGFP-FKBP1A, 349 ng/cm², frente a 563 ng/cm² y 677 ng/cm² para la HisTag-mOrange2-FKBP1A y HisTag- FKBP1A-mOrange2, respectivamente, podría deberse al impedimento estérico que disminuye la accesibilidad de la proteína a la superficie para su unión específica a través de la cola de histidinas.⁵²⁵

a) Elucidación de la disposición geométrica de las FKBP1A-FPs sobre la superficie del sensor de QCM

Adicionalmente, se estimaron las dimensiones de las proteínas llevando a cabo la modelización de cada uno de los dominios proteicos mediante el software Swiss Model.⁵²⁶

De hecho, la configuración geométrica de las proteínas, permite evaluar su disposición sobre el sustrato del sensor de QCM.

Las proteínas se esquematizaron como dos cilindros (la proteína fluorescente y la FKBP1A) y dos conectores flexibles (HisTag y GGGs). Al formarse el complejo entre la cola de histidina con el Ni^{2+} de la superficie, la proteína puede adoptar diferentes orientaciones (**Figura 51A**) que ocuparan áreas de diferentes tamaños. Se consideraron las proyecciones de área rectangular (A, B y D), así como un área circular (C) debido a la mayor flexibilidad de la cadena GGGs.

Se realizó un estudio comparativo de los datos experimentales del espesor y del área molecular en saturación con las dimensiones estimadas a partir de la estructura tridimensional de las proteínas. Los datos cinéticos indicaron un proceso en varias etapas que indica cierta inclinación de las proteínas para conseguir la máxima cobertura, por lo que la conformación plana se excluyó de los cálculos. En la **Figura 51B-E** se muestran las conformaciones más probables de los cuatro sistemas analizados.

El mecanismo de unión entre el HisTag y el Ni-NTA se ha descrito ampliamente en bibliografía. Consiste en la formación de un complejo organometálico entre los tres grupos carboxilato y la amina terciaria del ditiobis(C_2NTA) con el Ni^{2+} , obteniéndose una estructura octaédrica que deja las dos posiciones libres hidratadas.⁵²⁷ Sobre esta configuración, dos histidinas de la proteína pueden formar un complejo con el níquel, anclándose en nuestro caso de manera estable a la superficie.⁵²⁸ La interacción de la cadena de hexa-histidina con el ion metálico implica un mecanismo cooperativo debido a los múltiples sitios de interacción con el sustrato,^{529,530} y al número variable de residuos de histidina que participan en la formación del complejo.⁵³¹ Knecht y col.⁵³² determinaron que en una cadena de 6 histidinas los residuos que contribuyen a la formación del complejo con Ni^{2+} se encuentran en las posiciones i e $i+2$ o i e $i+5$, lo que da lugar a una distancia media entre los residuos implicados de entre 7.4 y 12.3 Å. Considerando que una distancia media entre átomos vecinos de Ni^{2+} es de 12 Å, existen dos posibles soluciones geométricas diferentes: (i) dos histidinas de la secuencia 6xHisTag se unen al Ni^{2+} de una única molécula de ditiobis(C_2NTA) o, (ii) una unión múltiple a varias

moléculas vecinas de ditiobis(C₂NTA) de cuatro residuos de histidinas, teniendo en cuenta que la longitud del HisTag completamente estirada es de ~20 Å.

De acuerdo con esto, se pueden representar las áreas sensoras para los cuatro sistemas como los tableros de la **Figura 51**.

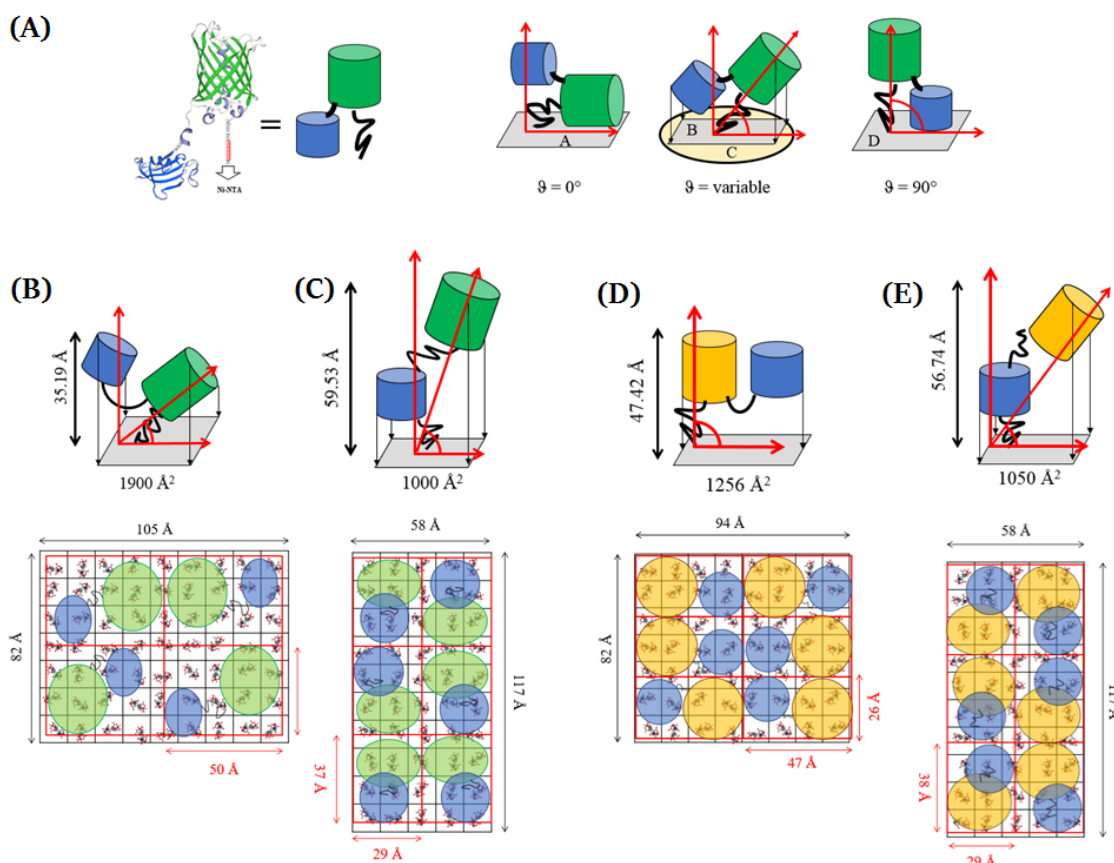


Figura 51. Representación de las proteínas de fusión en la interfase y su disposición en la superficie. (A) HisTag-EmGFP-FKBP1A, (B) HisTag-FKBP1A-EmGFP, (C) HisTag-mOrange2-FKBP1A and (D) HisTag-FKBP1A-mOrange2.

b) Unión del FK506 a las proteínas de fusión FKBP1A-FP

La interacción del FK506 con las diferentes proteínas se monitorizó añadiendo disoluciones patrón del analito, entre 1 pmol/L y 10 nmol/L en PBS, sobre las distintas superficies modificadas del sensor hasta obtener un desplazamiento de frecuencia constante. La **Figura 52** muestra la variación de la densidad de masa, obtenida a partir del desplazamiento de la frecuencia, producido por la unión del FK506 a las proteínas FKBP1A-FPs inmovilizadas en la superficie de los cuatro sensores. En todos los casos, la variación de la energía de disipación del tercer armónico ($\Delta D_3/3$) resultó ser muy

pequeña, lo que indica que la unión del FK506 no induce ningún cambio en las propiedades viscoelásticas de las capas superficiales de las proteínas.

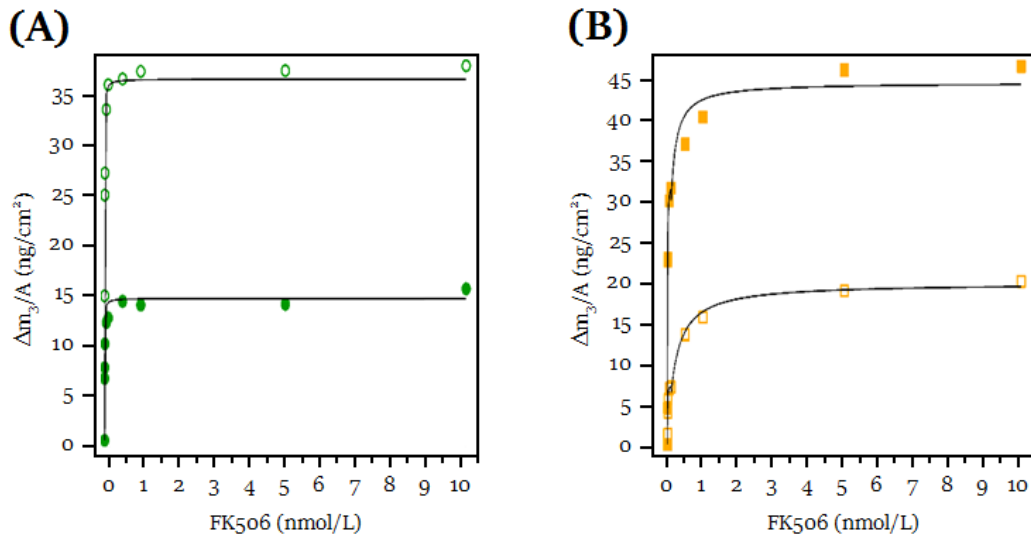


Figura 52. Cambios en la densidad de masa de la superficie al adsorberse diferentes concentraciones de FK506 empleando sensores QCM modificados con **(A)** HisTag-FKBP1A-EmGFP (○), HisTag-EmGFP-FKBP1A (●), **(B)** HisTag-FKBP1A-mOrange2 (□), HisTag-mOrange2-FKBP1A (■). Datos experimentales ajustados al modelo de Langmuir.

Si bien el FK506 es capturado firmemente en la superficie del sensor en todos los sistemas examinados, el mecanismo de unión varía en función de las proteínas de fusión inmovilizadas. En el caso de las construcciones con EmGFP, la adsorción del FK506 tiene lugar en un único paso y los datos se ajustan al modelo de Langmuir (Ecuación 16), en todo el intervalo de concentraciones.

Sin embargo, en las construcciones con mOrange2, la adsorción del FK506 tiene lugar mediante un mecanismo en dos etapas: 1) se produce la saturación parcial de la superficie con una concentración de FK506 de aproximadamente 100 pmol/L, pudiéndose ajustar con éxito al modelo de Langmuir; 2) la interacción del FK506 con la proteína quimera puede producirse a través de sitios de unión menos accesibles, ya que las proteínas que contienen la mOrange2 forman superficies más compactas que las formadas por la EmGFP (**Figura 51**).

En la **Tabla 18** se muestran las constantes calculadas para cada una de las proteínas recombinantes fluorescentes estudiadas. Los valores obtenidos están afectados por el hecho de que las proteínas de fusión están inmovilizadas sobre la superficie con

una orientación y densidad fijas, y que el receptor FKBP1A se encuentra fusionado a una proteína fluorescente. Por ello, los valores obtenidos son menores que los descritos en disolución, utilizando como receptor la proteína FKBP1A nativa (0.6 –0.9 nmol/L para el FK506 y el Sir^{533,534}). Además, las diferencias obtenidas entre los valores de las constantes de disociación calculados para las cuatro proteínas estudiadas, también puede atribuirse a las diferentes conformaciones que adoptan sobre la superficie sensora, lo que afecta a la accesibilidad del FK506 al sitio de unión.

Tabla 18. Resumen de los principales parámetros obtenidos de los datos de la QCM para unión del FK506 a las diferentes proteínas de fusión inmovilizadas en las superficies.

	HisTag- EmGFP- FKBP1A	HisTag- FKBP1A- EmGFP	HisTag- mOrange2- FKBP1A	HisTag- FKBP1A- mOrange2
Primera etapa de adsorción				
Área molecular promedio de FK506 (Å ²)	907	384	396	1785
Constante de unión aparente K _d ' (pM)	2.7±1.2	1.7±0.4	3.4±0.9	4.2±0.4
Sgunda etapa de adsorción				
Área molecular promedio de FK506 (Å ²)	-	-	327	711
Constante de unión aparente K _d ' (pM)	-	-	49±17	213±30

4.2. Desarrollo de un bioensayo para la determinación de FK506 empleando partículas magnéticas y FKBP1A-EmGFP

4.2.1. Optimización de la inmovilización del FK506 sobre partículas magnéticas

Se han evaluado varios métodos para la inmovilización del FK506-COOH (0.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ partículas) a la superficie de las partículas magnéticas aminadas empleando EDC o EDC/sNHS. En ambos casos, se midió la señal de fluorescencia obtenida tras la adición de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgM anti-FK506 a las partículas modificadas (6.5 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$), seguido de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-IgM-AlexaFluor en PBST (apartado 3.2.4.1) para evaluar en qué condiciones se obtenía mayor señal analítica. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 53**. Se observa que la intensidad de fluorescencia obtenida empleando 16.8 mmol/L de EDC en combinación con 35 mmol/L sNHS es mucho mayor que en ausencia de succinimida. Este resultado puede atribuirse a que el éster formado entre el FK506-COOH y el sNHS es más estable frente a la hidrólisis en medio acuoso que el obtenido con EDC, lo que supone un aumento de la eficiencia de unión del derivado del inmunosupresor sobre la superficie aminada y, por tanto, un mayor rendimiento en la conjugación.⁵³⁵

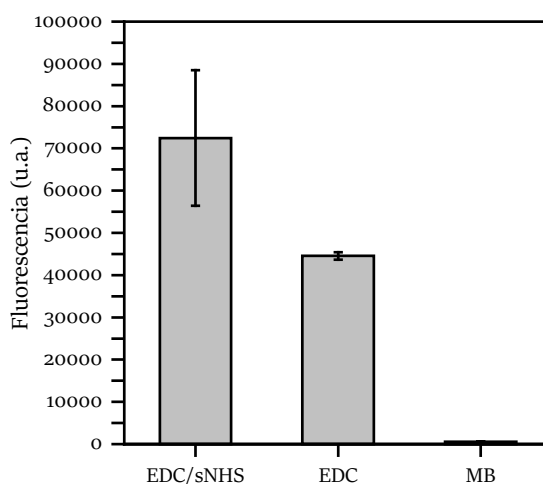


Figura 53. Fluorescencia obtenida tras la inmovilización covalente del FK506-COOH, empleando EDC o EDC/sNHS, sobre partículas magnéticas aminadas. [IgM anti-FK506] = 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBST, [anti-IgM-AlexaFluor] = 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBST, MB = 6.5 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$. Los resultados se representan como la media de las señales \pm el error estándar de la media (n = 3).

4.2.2. Optimización del bioensayo

4.2.2.1. Evaluación de las construcciones fluorescentes

Uno de los factores limitantes para la aplicación de proteínas de fusión como elementos de reconocimiento en bioensayos es su limitado reconocimiento de las moléculas diana.³⁸¹ Para evaluar el grado de interacción de las proteínas recombinantes sintetizadas (FKBP1A-mOrange2, mOrange2-FKBP1A, FKBP1A-EmGFP y EmGFP-FKBP1A) con el FK506, se realizaron los ensayos en ausencia de analito empleando diferentes concentraciones de las proteínas (0, 0.021, 0.21, 2.1 y 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y una concentración constante de partículas MB-FK506 (6.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), según se describe en el apartado 3.2.4.2. de los Materiales y Métodos.

En la **Figura 54** se muestran las señales de fluorescencia obtenidas en las distintas condiciones ensayadas. Como puede observarse, las proteínas de fusión marcadas con mOrange2 muestran poca afinidad por el FK506 y los intervalos dinámicos de respuesta son muy estrechos. Por otro lado, el receptor FKBP1A fusionado a EmGFP reconoce de forma significativa al derivado inmovilizado del inmunosupresor, alcanzándose una respuesta óptima para 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína recombinante, tanto de la forma FKBP1A-EmGFP como de EmGFP-FKBP1A.

La diferente capacidad de unión del FKBP1A al inmunosupresor dependiendo de si la proteína fluorescente se dispone en el extremo C-terminal o N-terminal del mismo, puede atribuirse a la diferencia conformacional entre ambas proteínas recombinantes, que afecta el sitio de unión del FK506. Como puede observarse en la **Figura 54**, las señales de fluorescencia obtenidas para ambas proteínas son estadísticamente comparables. Sin embargo, el uso de la FKBP1A con la EmGFP situada en su extremo C-terminal permite obtener resultados más reproducibles, por lo que fue seleccionada para futuros ensayos.

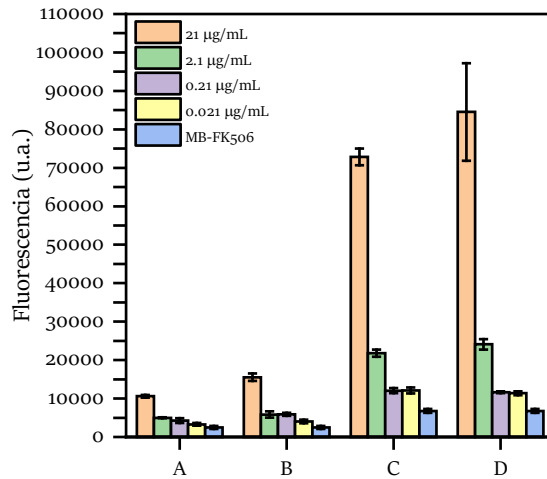


Figura 54. Evaluación del efecto de la estructura de la proteína recombinante fluorescente en el bioensayo. Se emplearon diferentes concentraciones de las proteínas: 0, 0.021, 0.21, 2.1 y 21 µg/mL y una concentración constante de MB-FK506 (6.5 µg/mL). A: FKBP1A-mOrange2, B: mOrange2-FKBP1A, C: FKBP1A-EmGFP, D: EmGFP-FKBP1A. Los resultados se representan como la media de las señales ± el error estándar de la media (n = 3).

4.2.2.2. Selección de la concentración de proteína fluorescente y de MB-FK506

Para optimizar la combinación de concentraciones de proteína recombinante y MB-FK506 adecuadas para la realización de las medidas, se llevó a cabo un ensayo de titulación en damero o *checkerboard*. Se emplearon concentraciones de FKBP1A-EmGFP en el intervalo de 1.3 a 6.7 µg/mL y de 2 a 8 µg/pocillo de MB-FK506, en ausencia y en presencia de 50 ng/mL de FK506.

Como se muestra en la **Figura 55**, la combinación de 5.25 µg/mL de FKBP1A-EmGFP con 7 µg de MB-FK506 permitió obtener mayor sensibilidad, dentro de las condiciones probadas, y una buena reproducibilidad. En consecuencia, se seleccionaron estos parámetros para los siguientes ensayos.

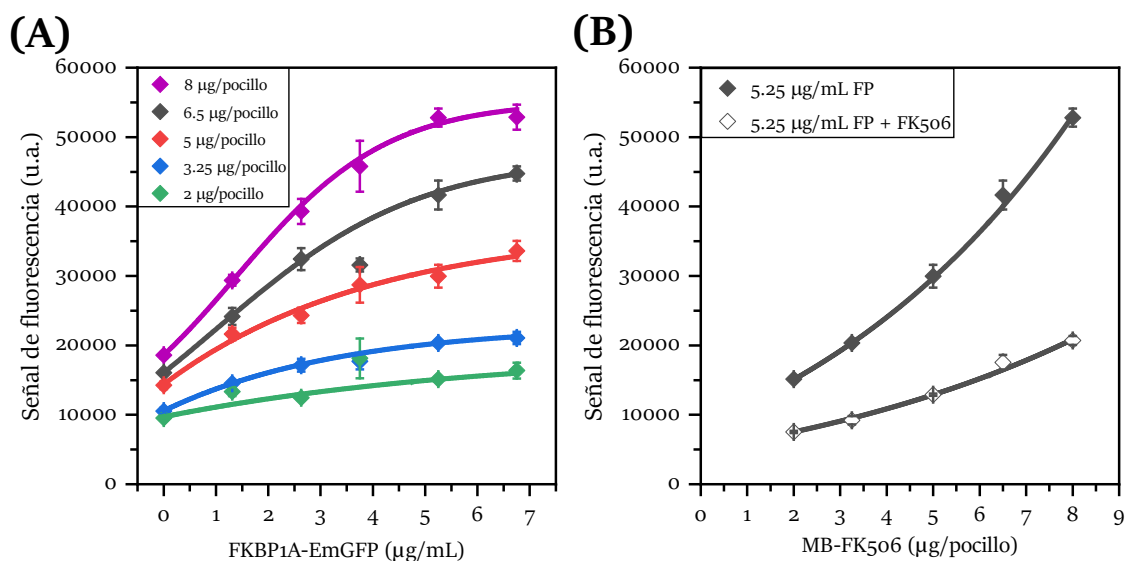


Figura 55. Optimización de las concentraciones de reactivos empleadas en el bioensayo. **(A)** Curvas de dilución de la proteína recombinante FKBP1A-EmGFP frente a diferentes concentraciones de MB-FK506. **(B)** Curvas de dilución para las MB-FK506 frente a la proteína recombinante FKBP1A-EmGFP en ausencia (◆, n = 3) y presencia de 50 µg/mL FK506 (◇, n = 3). Los resultados se representan como la media de las señales ± el error estándar de la media (n = 3).

4.2.2.3. Selección de la disolución amortiguadora

El reconocimiento del FK506 por parte de la proteína recombinante depende notablemente del medio en el que se realiza la medida, ya que éste puede afectar a las interacciones producidas entre ellos (enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, fuerzas de van der Waals, etc.).¹³⁴

Con el fin de determinar la composición óptima de la disolución amortiguadora, se llevaron a cabo ensayos en ausencia (B_0) y presencia de 50 ng/mL de FK506 (B_{50}), para determinar en que condiciones se conseguía mayor sensibilidad para la determinación del analito empleando las MB modificadas con el derivado de FK506.

Los datos mostrados en la **Figura 56** indican que cuando se emplean PBS, HEPES o TRIS, en ausencia de detergente, las uniones no específicas son elevadas y no se observa el reconocimiento específico del FK506. Sin embargo, cuando se utiliza PBS suplementado con 0.05% de Tween 20 (PBST) se minimizan significativamente las interacciones no específicas entre las MB-FK506 y la proteína de fusión.

En consecuencia, se seleccionó el PBST como disolución reguladora para posteriores análisis al ser la que mostraba una mejor respuesta.

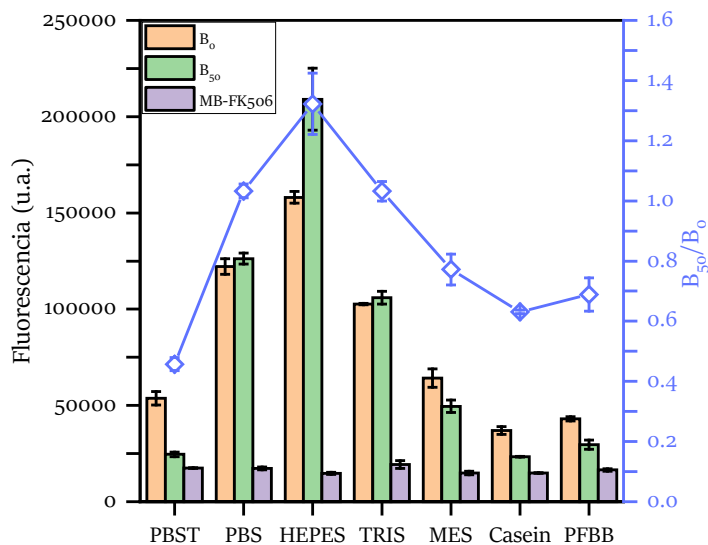


Figura 56. Efecto de la composición de la disolución amortiguadora empleada en el bioensayo sobre la relación B_{50}/B_0 (símbolos abiertos). PBST: tampón fosfato (10 mmol/L, pH 7.4) con Tween 20 (0.05%); PBS: tampón fosfato (10 mmol/L, pH 7.4); HEPES: tampón HEPES (50 mmol/L, pH 8); TRIS: tampón Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8), MES: tampón MES (0.1 mol/L, pH 4.7), Casein: tampón de caseína (1%) en PBS; PFBB: tampón de bloque libre de proteínas Pierce®. Las barras amarillas corresponden a la señal de fluorescencia medida en ausencia de inmunosupresor (B_0), las barras grises a la señal obtenida en presencia de 50 ng/mL de FK506 (B_{50}) y las barras naranjas a la señal medida en ausencia de FKBP1A-EmGFP. [FKBP1A-EmGFP] = 7.5 μ g/mL, [MB-FK506] = 5 μ g/medida. Los resultados se representan como la media de las señales \pm el error estándar de la media (n = 3).

4.2.2.4. Tiempo de incubación

Un parámetro clave para el desarrollo del bioensayo, y que influye en la sensibilidad del mismo, es el tiempo de incubación necesario para que se produzca la interacción entre la FK506-EmGFP y el FK506 inmovilizado en ausencia y presencia del fármaco en su forma libre. En el presente estudio se ha optimizado el tiempo de incubación de la proteína recombinante con el analito libre presente en la muestra y el tiempo de incubación con las MB-FK506.

Para llevar a cabo este estudio, se incubaron en primer lugar concentraciones de FK506 en el intervalo entre 0 y 500 ng/mL con 5.25 μ g/mL de FKBP1A-EmGFP durante 15, 25 y 35 min. Seguidamente, la mezcla se puso en contacto durante 15 min con 7 μ g/pocillo de MB-FK506 y se midió la intensidad de fluorescencia obtenida.

Como se muestra en la **Figura 57**, al incrementar el tiempo de incubación de 15 a 25 min se consigue un aumento de la sensibilidad del ensayo. Sin embargo, el empleo de tiempos superiores origina una mayor irreproducibilidad de las medidas (RSD > 31%).

Por ello, se seleccionó un tiempo de incubación de 25 min como valor óptimo para los siguientes ensayos.

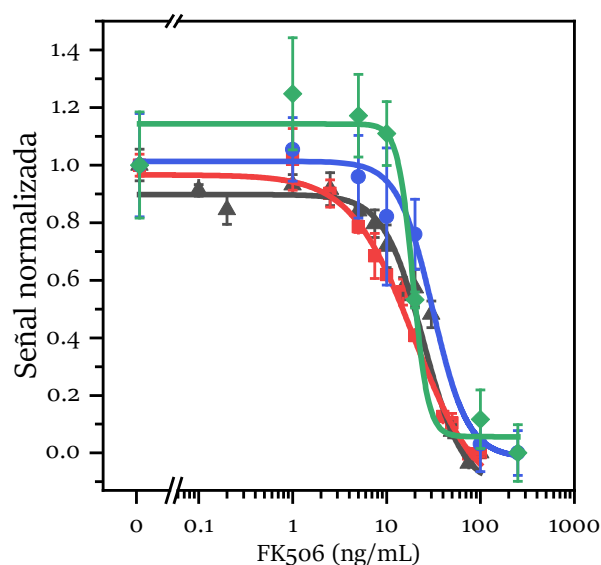


Figura 57. Efecto del tiempo de incubación en la sensibilidad del bioensayo. Las curvas de calibrado corresponden a tiempos de incubación entre la proteína recombinante FKBP1A-EmGFP y el FK506 de 15 min (\blacktriangle , 14 puntos), 25 min (\blacksquare , 12 puntos) y 35 min (\bullet , 7 puntos), seguidos de 15 min de captura con las MB-FK506 (7 μ g/pocillo); y de 25 min de incubación entre la proteína recombinante FKBP1A-EmGFP y el FK506, seguidos de 35 min de captura con las MB-FK506 (\blacklozenge , 7 puntos). Los resultados se representan como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

Del mismo modo, se estudió el efecto de incrementar el segundo tiempo de incubación de 15 min a 25 min. Como puede observarse en la **Figura 57**, esta modificación originó una mayor irreproducibilidad ($RSD > 25\%$) y una disminución de la sensibilidad. Por ello, se seleccionó un segundo tiempo de incubación de 15 min para los ensayos posteriores.

4.2.2.5. Bloqueo de las partículas magnéticas empleadas en el ensayo

Para evaluar el efecto de agentes bloqueantes sobre la señal analítica, la superficie de las partículas magnéticas se bloqueó durante al menos una 1 h, después de su funcionalización con el FK506-COOH, con un tampón de caseína y un tampón comercial libre de proteínas. La **Figura 58** muestra las curvas de calibrado obtenidas en ambos casos, observándose que los calibrados son similares. Sin embargo, el uso de partículas sin bloquear permite obtener un intervalo dinámico más amplio y un LOD menor que empleando un agente de bloqueo, por lo que se descartó su uso para ensayos posteriores.

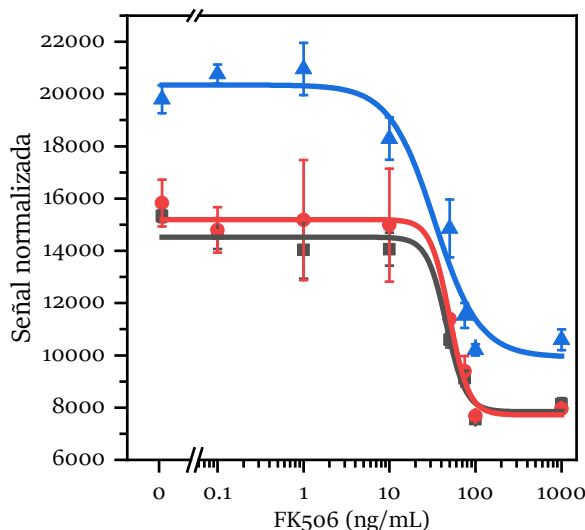


Figura 58. Comparación de las curvas de calibrado obtenidas para FK506 empleando en el ensayo MB-FK506 sin bloquear (▲, 8 puntos), bloqueadas durante 1 h con un tampón de caseína (■, 8 puntos) y bloqueadas durante 1 h con un tampón de bloqueo comercial libre de proteínas (●, 8 puntos). Los resultados se representan como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

4.2.2.6. Evaluación del efecto de la temperatura

La temperatura es un factor que afecta a los bioensayos, dado que al incrementarse aumenta la velocidad de difusión de las moléculas en disolución, disminuyendo el tiempo de respuesta. Sin embargo, debe de encontrarse un valor de compromiso, ya que el aumento de la temperatura puede ocasionar la desnaturalización de las biomoléculas.

Para determinar las condiciones óptimas de temperatura, se realizaron curvas de calibrado con disoluciones estándar de FK506 a diferentes temperaturas de incubación (4 °C, 18 °C y 37 °C).

Como se observa en la **Figura 59**, los valores de IC_{50} son muy similares en los tres casos (4 °C: 46 ng/mL, 18 °C: 44 ng/mL y 37 °C: 55 ng/mL). Sin embargo, al realizar el ensayo a 18 °C se obtuvo un menor LOD y un mayor intervalo dinámico frente a las demás temperaturas ensayadas (17 - 114 ng/mL vs. 40 - 74 ng/mL a 37 °C y 41 - 51 ng/mL a 4 °C). Además, la reproducibilidad de las medidas realizadas a 4 °C y a 37 °C también fueron menores que a 18 °C, por lo que se seleccionó esta temperatura para los ensayos posteriores.

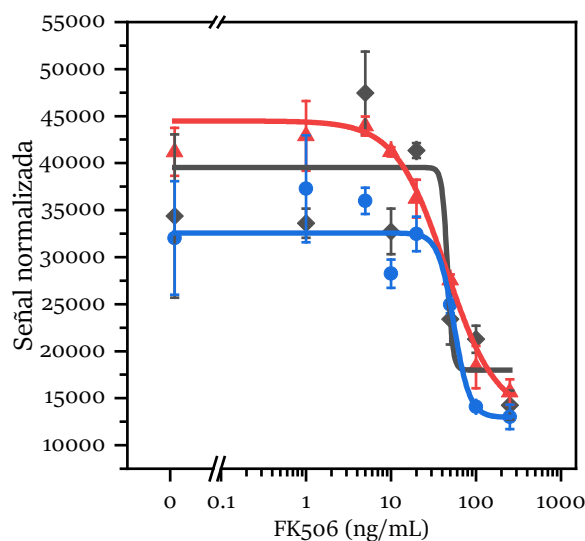


Figura 59. Efecto de la temperatura sobre la respuesta del bioensayo. Curvas de calibrado correspondientes a la determinación de FK506 en PBST a 4 °C (◆, 8 puntos), 18 °C (▲, 8 puntos) y 37 °C (●, 8 puntos). Los resultados se representan como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

4.2.2.7. Caracterización analítica

A partir de los parámetros optimizados, se procedió a determinar las características analíticas del bioensayo de fluorescencia para la determinación de FK506. Se realizaron curvas de calibrado empleando disoluciones patrón del analito en PBST en el intervalo de 0 a 500 ng/mL.

En la **Figura 60** se muestra la curva de calibrado obtenida al ajustar las señales normalizadas a una ecuación logística de cuatro parámetros (Ecuación 2). El intervalo dinámico se estimó entre 5 y 70 ng/mL (intervalo de concentraciones que originan una variación de la señal respecto al blanco entre un 20% y un 80%), el LOD corresponde a un valor de 3 ng/mL (concentración que origina una disminución de la señal respecto del blanco del 10%) y el valor IC_{50} corresponde a una concentración de 19 ng/mL para FK506.

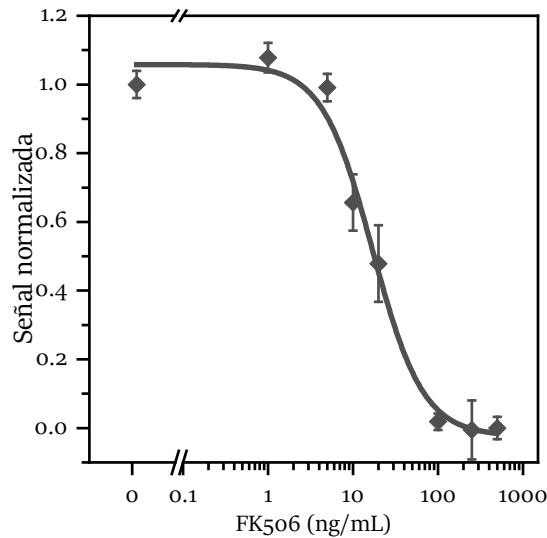


Figura 60. Curva de calibrado correspondiente al bioensayo para la detección de FK506 en PBST. [FKBP1A-EmGFP] = 5.25 $\mu\text{g/mL}$, [MB-FK506] = 7 $\mu\text{g/medida}$. Los resultados se representan como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

La reproducibilidad de la medida se evaluó realizando 3 calibrados en días alternos, para el mismo intervalo de concentraciones (0 – 500 ng/mL). A partir de los mismos se calculó un IC_{50} medio de 19 ng/mL, con una RSD del 15%. En ensayos de unión de ligandos, el RSD ha de ser inferior al 25%, por lo que el valor obtenido se considera satisfactorio.

El LOD y el DR del ensayo desarrollado cumplen con las especificaciones médicas para la detección y cuantificación del FK506, donde el intervalo terapéutico para pacientes trasplantados con un riesgo normal de rechazo se encuentra entre el 5 y 20 ng/mL de FK506 en sangre entera.⁷¹ Por otra parte, el bioensayo desarrollado muestra un DR más amplio que los ensayos comerciales disponibles, y el protocolo puede automatizarse fácilmente.

Comparado con otros inmunoensayos y kits comerciales empleados para la cuantificación de FK506, el método desarrollado presenta una sensibilidad ligeramente inferior en PBST, aunque es necesario valorar que sucede en muestras de sangre, ya que muchos autores no evalúan estos parámetros en muestras reales que es donde deben realizarse las determinaciones.

Para determinar la selectividad del método, se evaluaron las reactividades cruzadas comparando la curva de calibrado obtenida para el FK506 con las correspondientes a compuestos potencialmente interferentes. En la presente Tesis Doctoral se midieron las curvas de calibrado para los inmunosupresores MPA y Sir, administrado habitualmente con el FK506 en el tratamiento de pacientes trasplantados.

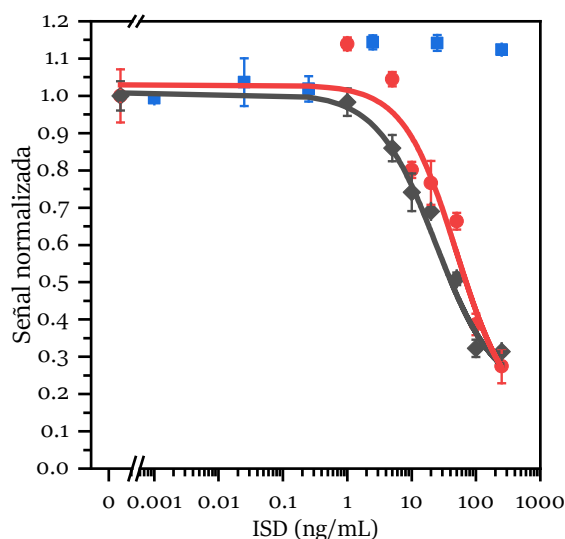


Figura 61. Curvas de calibrado correspondientes al bioensayo para el FK506 (♦, $n = 3$, 8 puntos), MPA (◆, $n = 3$, 7 puntos) y Sir (◆, $n = 3$, 8 puntos) en PBST. [FKBP1A-EmGFP] = 5.25 $\mu\text{g/mL}$, [MB-FK506] = 7 $\mu\text{g/medida}$. Los resultados se representan como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

En la **Figura 61**, se observa que no existe reactividad cruzada con el MPA (concentración total en sangre 1.9 – 4 $\mu\text{g/mL}$).⁵⁴ No obstante, el Sir (concentración total en sangre 5 – 15 ng/mL)⁵³⁶ induce una respuesta similar a la de FK506 en el ensayo, con un valor IC_{50} de 50 ng/mL , lo que conlleva una reactividad cruzada del 38%. Este fármaco tiene una estructura similar a la del FK506 y, como se señala en la literatura, también es reconocido por el FKBP1A en el cuerpo humano.^{9,10} Los resultados obtenidos demuestran que el bioensayo se puede emplear para la detección y cuantificación de FK506 en muestras de pacientes co-medicados con MPA.

4.2.2.8. Reproducibilidad de la funcionalización de las partículas magnéticas

Para evaluar la reproducibilidad del proceso de funcionalización de las partículas magnéticas con el FK506-COOH, se llevaron a cabo ensayos con dos lotes producidos en diferentes días siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.4.1.

Como se puede apreciar en la **Figura 62**, no existen diferencias significativas entre ambos lotes. Esto demuestra que el procedimiento de funcionalización de las partículas magnéticas es reproducible y robusto.

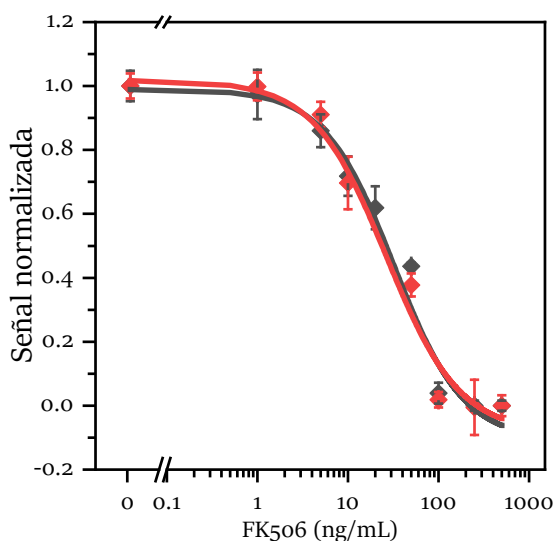


Figura 62. Estudio de reproducibilidad entre distintos lotes de partículas magnéticas. Curvas de calibrado correspondientes al bioensayo para FK506 empleando dos lotes diferentes de MB-FK506. Lotes 1 (negro) y 2 (rojo). [FKBP1A-EmGFP] = 5.25 μ g/mL, [MB-FK506] = 7 μ g/medida. Los resultados se representan como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

4.2.2.9. Efecto matriz en muestras biológicas

Los estudios del efecto matriz se llevaron a cabo preparando las curvas de respuesta frente al analito en muestras sanguíneas control, libres del fármaco, tratadas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.4.3.

El extracto de las muestras de sangre entera se salpicó con concentraciones crecientes de FK506 (0 – 500 ng/mL) antes del análisis. Los resultados mostrados en la **Figura 63** demuestran que no existen diferencias significativas entre el calibrado realizado en tampón PBST y en los extractos de muestra salpicada. La ausencia de dicho efecto indica que el ensayo no se ve afectado por la presencia de otras especies presentes

en sangre. En consecuencia, no es necesaria la dilución del extracto antes del análisis y se puede realizar la cuantificación del FK506 directamente empleando un calibrado externo en tampón fosfato. Este resultado pone en valor la compatibilidad del bioensayo desarrollado para su aplicación al análisis de matrices complejas, en contraposición a los tratamientos tediosos que suelen requerirse en la mayoría de los inmunoensayos descritos en literatura y los kits comerciales, para el análisis de FK506.

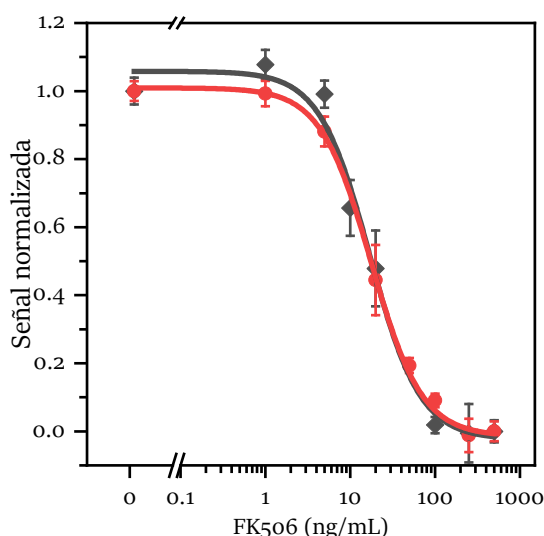


Figura 63. (A) Curvas de calibrado para FK506 en PBST (◆, $n = 3$) y en extracto de sangre entera (●, $n = 3$), usando la proteína recombinante FKBP1A-EmGFP y MB-FK506. Los resultados se representan como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

4.2.2.10. Aplicación en el análisis de muestras reales

El bioensayo optimizado se aplicó, en primer lugar, a la determinación del inmunosupresor en muestras de sangre entera salpicadas con un patrón de FK506 (10, 13, 16 and 20 ng/mL). El fármaco se extrajo precipitando las proteínas con MeOH seguido de sonicación y de una etapa de evaporación y reconstitución en PBST, previo al análisis. Como se muestra en la **Tabla 19**, no existen diferencias significativas entre la concentración de FK506 adicionada a las muestras y la determinada mediante el bioensayo desarrollado, a ninguno de los niveles de concentración ensayados. Los resultados demuestran la efectividad del método, alcanzándose valores medios de recuperación entre el 87 y el 109%.

Tabla 19. Estudio de recuperación del bioensayo para la cuantificación de FK506 en muestras de sangre ($n = 3$).

Concentración nominal de FK506 (ng/mL)	Concentración medida (ng/mL)	RSD (%)	Recuperación (%)
10	10	5	104
13	14	6	109
16	15	13	95
20	18	9	87

RSD: Desviación estándar relativa (del inglés *Relative standard deviation*)

A continuación, se analizaron muestras de sangre entera de pacientes trasplantados tratados con el fármaco, proporcionadas por el Dr. J. Bustamante Munguira del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Los resultados se compararon con los medidos en un laboratorio externo empleando el método el ARCHITECT iSystem. Como se muestra en la **Figura 64**, no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante el bioensayo desarrollado y el ensayo comercial, lo que demuestra su aplicabilidad al análisis de muestras de sangre entera. En el caso de la muestra HCUV4 se encontró una concentración superior a 30 ng/mL, lo que impidió su cuantificación con el CMIA comercial. Sin embargo, el bioensayo permitió su cuantificación al presentar un mayor intervalo dinámico. No se detectó FK506 en las muestras de control.

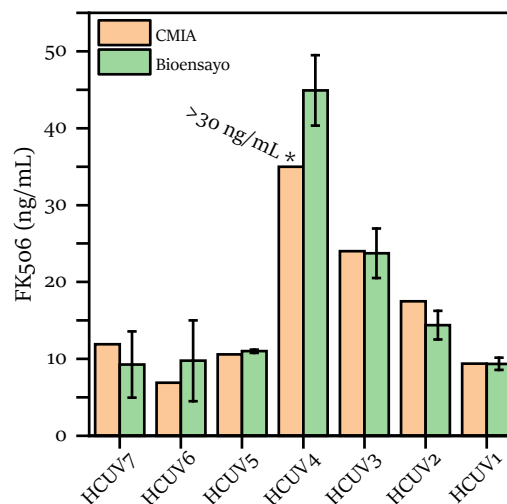


Figura 64. Comparación del rendimiento del bioensayo basado en el fluorocaptor FKBP1A-EmGFP y del CMIA ($RSD \leq 10\%$) para la cuantificación de FK506 en muestras de sangre entera de pacientes trasplantados.

4.3. Aplicación de las proteínas de fusión fluorescentes al desarrollo de bioensayos empleando micromotores

El presente capítulo de esta Tesis Doctoral se ha realizado durante una estancia en el laboratorio del Prof. Alberto Escarpa de la Universidad de Alcalá de Henares en colaboración con la Dra. Beatriz Jurado Sánchez.

4.3.1. Selección del tipo de micromotor

4.3.1.1. Micromotores tubulares

Se han sintetizado micromotores tubulares con diferentes composiciones superficiales a fin de evaluar cuál de ellos permitía determinar FK506 con mayor sensibilidad.

Los micromotores tubulares se prepararon mediante una electrodeposición directa sobre una plantilla. Para ello, se emplearon membranas de policarbonato (5 μm) con microporos en forma cónica, en las que una cara de la membrana se cubrió con una capa nanométrica de oro que se utiliza como electrodo de trabajo. Se empleó un hilo de Pt como contraelectrodo y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 mol/L KCl). La membrana se montó en una celda de teflón con papel de aluminio que servía de contacto eléctrico para la posterior electrodeposición de las diferentes capas del micromotor.

Tras la electrodeposición de las diferentes capas, el oro de las membranas se eliminó mediante pulido con una lechada de alúmina de 1 μm . Para liberar los micromotores, la membrana se disolvió por tratamiento con diclorometano durante 30 min (2 veces). Tras centrifugar (3 min, 9000 rpm), los micromotores se lavaron con isopropanol, etanol y agua, conservándose en este medio hasta su empleo.

a) Micromotores poliméricos a partir de ácido 3-aminofenilborónico

En primer lugar se sintetizaron micromotores poliméricos a partir del ácido 3-aminofenilborónico (APBA), controlando la polimerización electroquímica de una disolución acuosa que contenía 80 mmol/L del APBA, 0.3 mol/L de sulfato sódico y 0.125 mol/L de HCl. La electropolimerización se realizó aplicando un voltaje +0.9 V y usando una carga de 0.6 C.⁵³⁷ A continuación, se depositó una capa interior de

nanopartículas de Pt aplicando un voltaje de -0.4 V durante 750 s en una disolución acuosa que contenía 4 mmol/L de H_2PtCl_6 y 0.5 mol/L de ácido bórico.

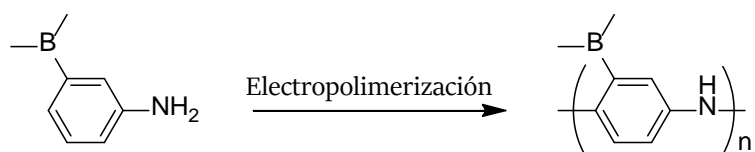


Figura 65. Esquema de la electropolimerización del 3-aminofenilborónico en los poros de las membranas de policarbonato.

Los micromotores tubulares de poliAPBA (PAPBA) sintetizados se funcionalizaron con el FK506-COOH siguiendo un protocolo similar al descrito en el apartado 3.3.4 de esta sección, resuspendiendo 21860 micromotores en 265 μL tampón MES y añadiendo sobre ellos 35.1 μL de FK506-COOH (10 mg/mL), 100 μL de EDC (57.5 mg/mL) y 100 μL de sNHS (57.5 mg/mL). Tras una incubación de 16 h, con agitación a temperatura ambiente, las partículas se lavaron tres veces con 500 μL de tampón MES y dos veces con 500 μL de tampón PBS, resuspendiéndose en un volumen final de 250 μL de tampón PBS.

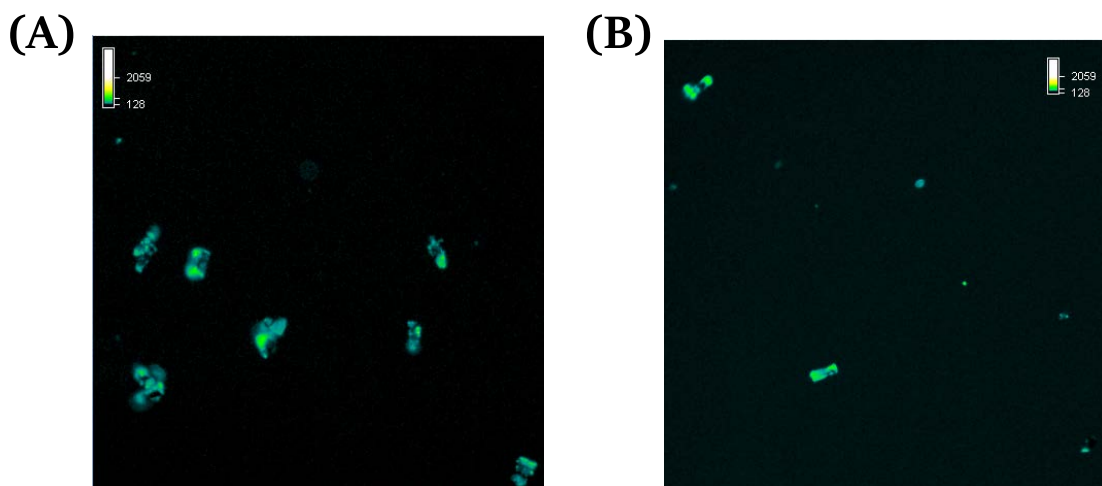


Figura 66. Imágenes de fluorescencia de los micromotores sintetizados a partir de APBA **(A)** funcionalizados con FK506 y **(B)** sin funcionalizar. λ_{exc} : 480/30 nm, espejo dicróico: 505 nm, λ_{em} : 535/45 nm.

Seguidamente, aproximadamente 2540 micromotores se resuspendieron 30 μL de una disolución de 5.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína recombinante FKBP1A-EmGFP. Tras una incubación de 25 min, los micromotores se centrifugaron y se lavaron con PBST para

evaluar la unión de la proteína fluorescente FKBP1A-EmGFP a la superficie de los micromotores. Como control se emplearon micromotores de PAPBA sin funcionalizar con el inmunosupresor. En ambos casos se observó fluorescencia (**Figura 66**) en la superficie del micromotor, debida a la unión de la proteína recombinante, sin que existieran diferencias significativas entre la señal obtenida para los micromotores funcionalizados con FK506 y los controles. Por todo ello se concluye que la proteína se adsorbe inespecíficamente sobre la superficie polimérica.

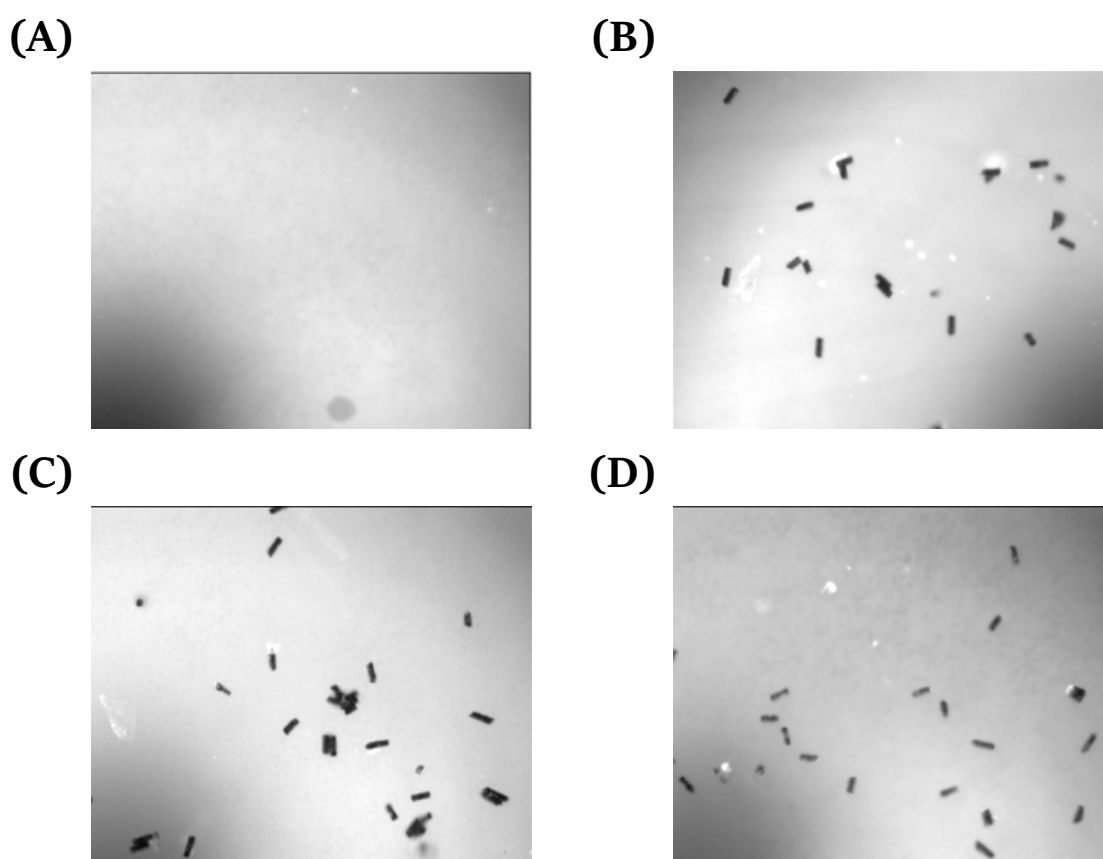


Figura 67. Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia para una disolución 5.25 $\mu\text{g/mL}$ de proteína fluorescente FKBP1A-EmGFP: **(A)** en ausencia de micromotores, **(B)** tras añadir los micromotores (0 min), **(C)** tras una incubación de 10 min, y **(D)** tras una incubación de 20 min. Micromotores PAPBA-FK506 bloqueados con BSA. λ_{exc} : 480/30 nm, espejo dicróico: 505 nm, λ_{em} : 535/45 nm.

Para disminuir las uniones no específicas observadas al incubar los micromotores con la proteína receptora, se bloquearon con una disolución de BSA al 3%. Tras 90 min de incubación, se lavaron tres veces con PBST y se llevó a cabo el mismo ensayo que con los micromotores sin bloquear midiéndose la fluorescencia de la FKBP1A-EmGFP en ausencia y en presencia de los mismos tras distintos tiempos de incubación (0, 10 y

20 min). Como se muestra en la **Figura 67**, la señal de fluorescencia obtenida en los micromotores es despreciable, incluso para un tiempo de incubación de 20 min, por lo que se descartó esta aproximación.

b) Micromotores de carbono mesoporoso

Los micromotores de carbono mesoporoso (CB) se prepararon por deposición directa sobre la membrana. En primer lugar, se preparó una dispersión de CB (0.1 mg/mL) en una disolución de Na_2SO_4 (0.5 mol/L) sonicando durante 15 min. A continuación, la dispersión se colocó en una celda de teflón y se dejó reposar durante 30 min, lo que favorece la formación de una película de CB en los poros de la membrana. A continuación, se depositó una capa interior catalítica de nanopartículas de Pt mediante amperometría aplicando un voltaje de -0.4 V durante 750 s a una disolución acuosa que contenía 4 mmol/L de H_2PtCl_6 y 0.5 mol/L de ácido bórico.

Dado que estos micromotores no presentan grupos funcionales en la superficie para la unión covalente del FK506-COOH, y considerando que la red de C es muy hidrofóbica,⁵³⁸ se llevó a cabo la inmovilización del inmunosupresor por adsorción. Para ello, los micromotores se resuspendieron en 100 μL de una disolución de 100 $\mu\text{g/mL}$ de FK506 durante 16 h. Pasado este tiempo, se lavaron y se pusieron en contacto con una disolución de 5.25 $\mu\text{g/mL}$ de proteína fluorescente FKBP1A-EmGFP. Tras una etapa de lavado con PBS, se midió la fluorescencia a diferentes tiempos, así como un control preparado en ausencia de FK506.

Como se observa en la **Figura 68**, tras 15 min de incubación no existen diferencias significativas entre las señales obtenidas para los micromotores funcionalizados con FK506 y los controles por lo que se descartó esta aproximación. Por otra parte, la fluorescencia se mantuvo tras sucesivos lavados con PBS, indicando que la proteína fluorescente se encuentra fuertemente adsorbida en la superficie de carbono.

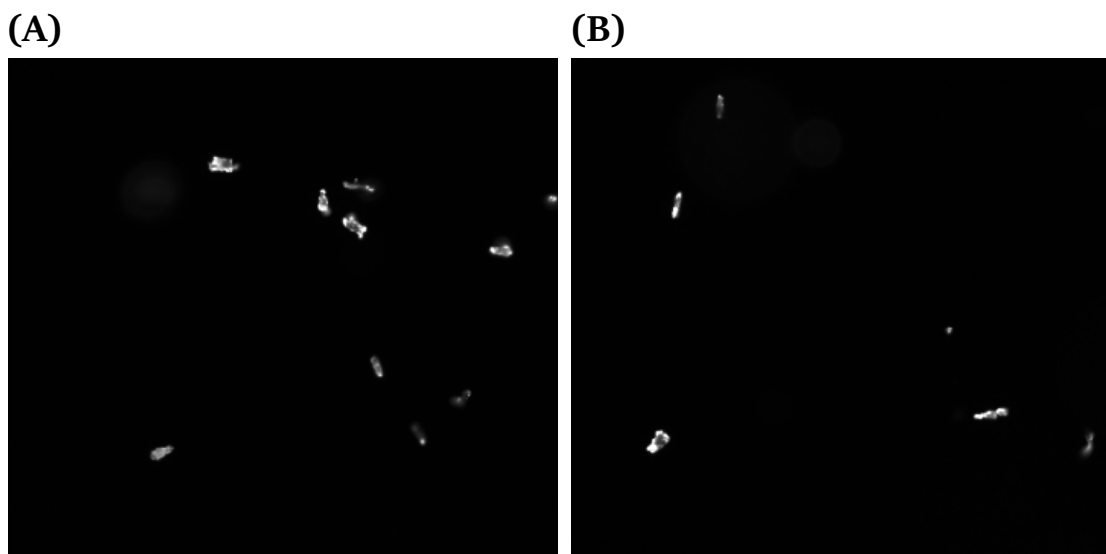


Figura 68. Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia para: (A) los micromotores CB modificados con FK506 adsorbido en la superficie y, (B) los micromotores control, tras 15 min de incubación con 5.25 $\mu\text{g/mL}$ de FKBP1A-EmGFP y un lavado con PBS. λ_{exc} : 480/30 nm, espejo dicróico: 505 nm, λ_{em} : 535/45 nm.

c) Micromotores de grafeno oxidado

Dado que el grafeno oxidado (GO) no presenta grupos amino en su superficie (**Figura 69**), se decidió aminorar los grupos carboxilo y epoxi con EDA.⁵³⁹⁻⁵⁴¹ Para ello se probaron dos estrategias diferentes, aminorar primero el GO y sintetizar los micromotores, o, sintetizar primero los micromotores y modificarlos después con EDA.

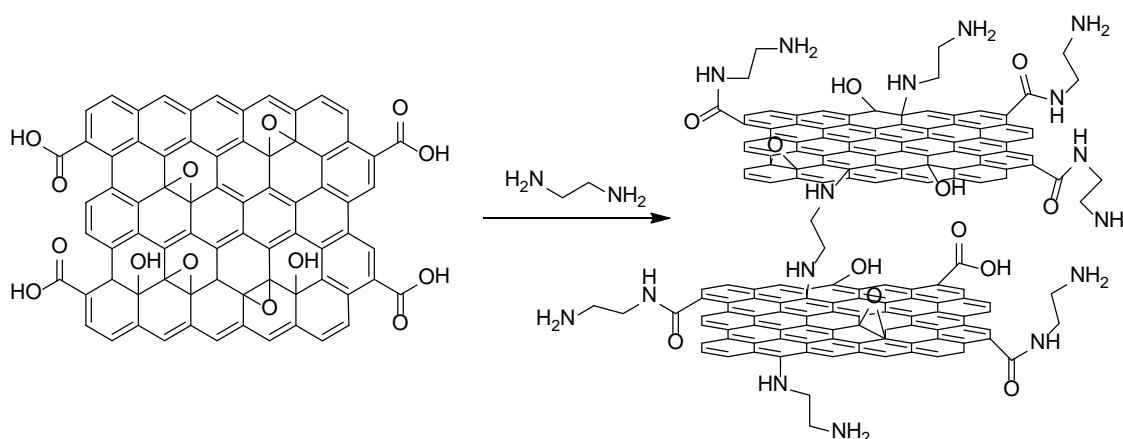


Figura 69. Ilustración esquemática de la modificación realizada al óxido de grafeno.

La aminación del GO (GO-EDA) se realizó adicionando 500 μL de una dispersión de GO (4 mg/mL) sobre 20 mL de una disolución de EDA (1 mol/L, pH 4.75) junto con 3 mg

de EDC. Tras una incubación de 180 min, se lavó 3 veces el GO-EDA con agua y se resuspendió en una disolución de Na_2SO_4 (0.5 mol/L) y H_2SO_4 (0.1 mol/L).

Las disoluciones de GO, o GO-EDA, se electrodepositaron mediante una voltamperometría cíclica (+0.3 a -1.5 V, 50 mV/s, 10 ciclos). A continuación, se incorporó una capa de Ni aplicando 10 ciclos de 0.1 s con un voltaje de -20 mV y un ciclo de -6 mV durante 300 s, de una disolución que contenía 30 mg/mL de sulfamato de níquel, 10.6 mg/mL de dicloruro de níquel y 30 mg/mL de ácido bórico a pH 4. Finalmente, se depositó una capa interior catalítica de nanopartículas de Pt por amperometría a -0.4 V durante 750 s de una disolución acuosa que contenía 4 mmol/L de H_2PtCl_6 y 0.5 mol/L de ácido bórico.

En el caso de los micromotores de GO, la aminación se llevó a cabo resuspendiendo 115000 micromotores en 1 mL de una disolución de EDA (1 mol/L, pH 4.75) junto con 2.2 mg de EDC. Tras agitar 90 min, en ausencia de luz, los micromotores se lavaron 3 veces y se guardaron en 500 μL de agua mili-Q hasta su uso.

En ambos casos la funcionalización se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que para los micromotores PAPBA.

En la **Figura 70A** y **B** se muestran las señales obtenidas tras incubar los dos tipos de micromotores con 5.25 $\mu\text{g/mL}$ de proteína fluorescente FKBP1A-EmGFP en presencia (B_1) y ausencia (B_0) de FK506. Los micromotores electrodepositados antes de la aminación muestran una mayor irreproducibilidad de la señal y no se observa una correlación entre ésta y la presencia del analito. En cambio, con los micromotores fabricados con GO aminado se obtienen diferencias significativas en la señal de fluorescencia obtenida en ausencia y presencia de FK506 trascurridos 10 min.

La animación previa del GO proporciona mejores resultados, probablemente debido a que no solo está aminada la superficie externa sino todas las láminas del grafeno. De esta forma, posibles descamaciones de la superficie no afectarían a la funcionalización con el FK506-COOH, por lo que será más efectiva.

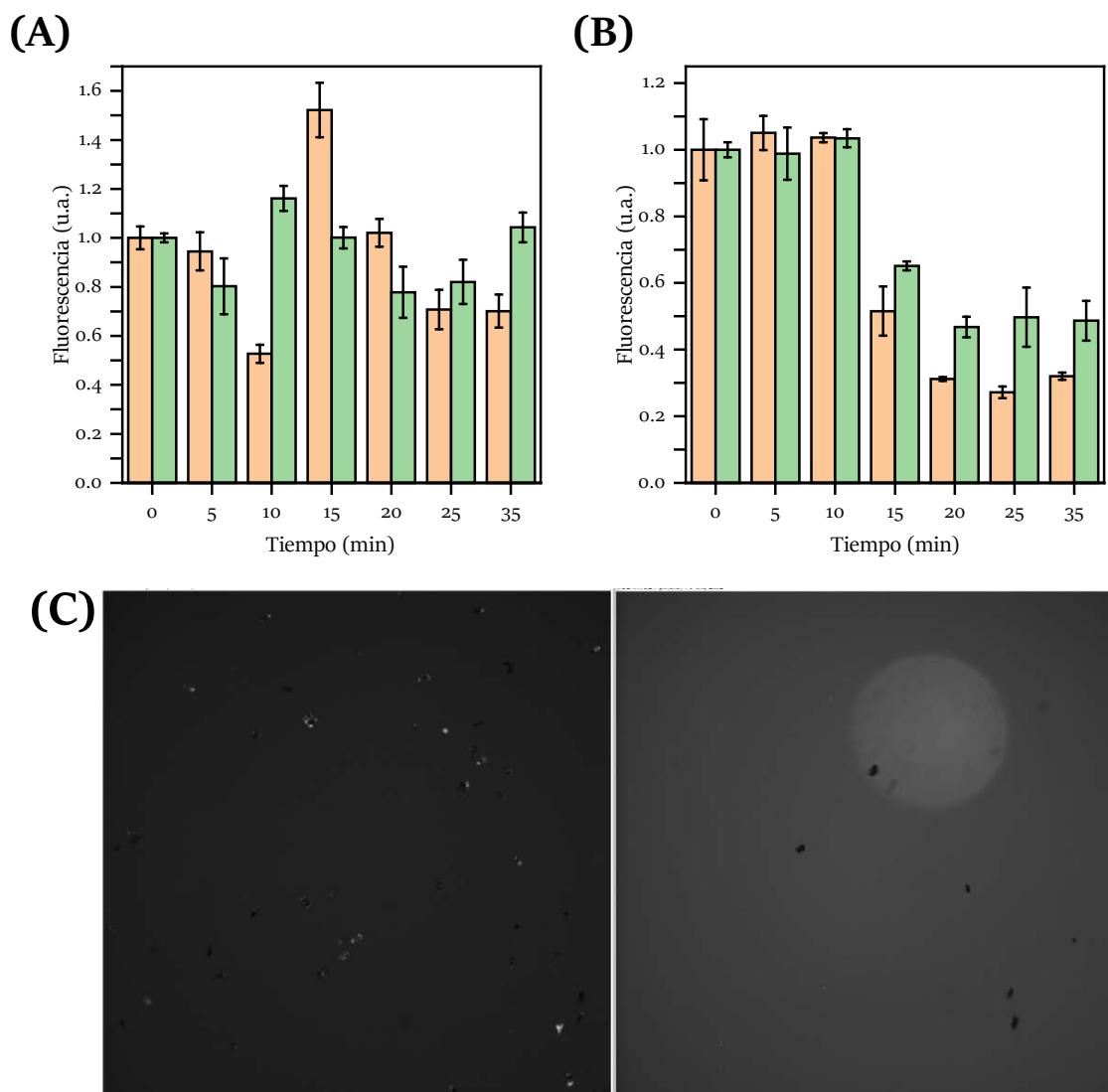


Figura 70. Señales de fluorescencia medidas para: **(A)** los micromotores de GO aminados después de la formación de los micromotores, y **(B)** los micromotores aminados antes de la electrodeposición en ausencia (naranja) y en presencia (verde) de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FK506 en PBS, junto a 5.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína fluorescente FKBP1A-EmGFP. **(C)** Imágenes de fluorescencia del ensayo con los micromotores en ausencia (izda) y en presencia (dcha) de FK506. λ_{exc} : 480/30 nm, espejo dicroico: 505 nm, λ_{em} : 535/45 nm.

Si bien esta estrategia resultó ser muy prometedora, los siguientes lotes de micromotores sintetizados no mostraron un comportamiento reproducible por lo que se descartaron para ensayos posteriores.

4.3.1.2. Micromotores esféricos

Los micromotores esféricos Janus de policaprolactona (PCL) se prepararon empleando la aproximación de la emulsión de “aceite en agua” descrita en el apartado 3.3.4. En esta síntesis las NPs tienden a acumularse en la superficie de las gotas de la

emulsión reduciendo la energía interfacial y dando lugar a una acumulación asimétrica como puede observarse en la **Figura 71A**.

Tras su síntesis, los motores de PCL funcionalizados con FK506 se pusieron en contacto con una disolución de 5.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína fluorescente FKBP1A-EmGFP en presencia (B_1) y ausencia (B_0) de FK506. Como se muestra en la **Figura 71C** existen diferencias significativas en la señal de fluorescencia en ausencia y presencia de FK506. Por ello, se seleccionó este tipo de micromotor para los sucesivos ensayos.

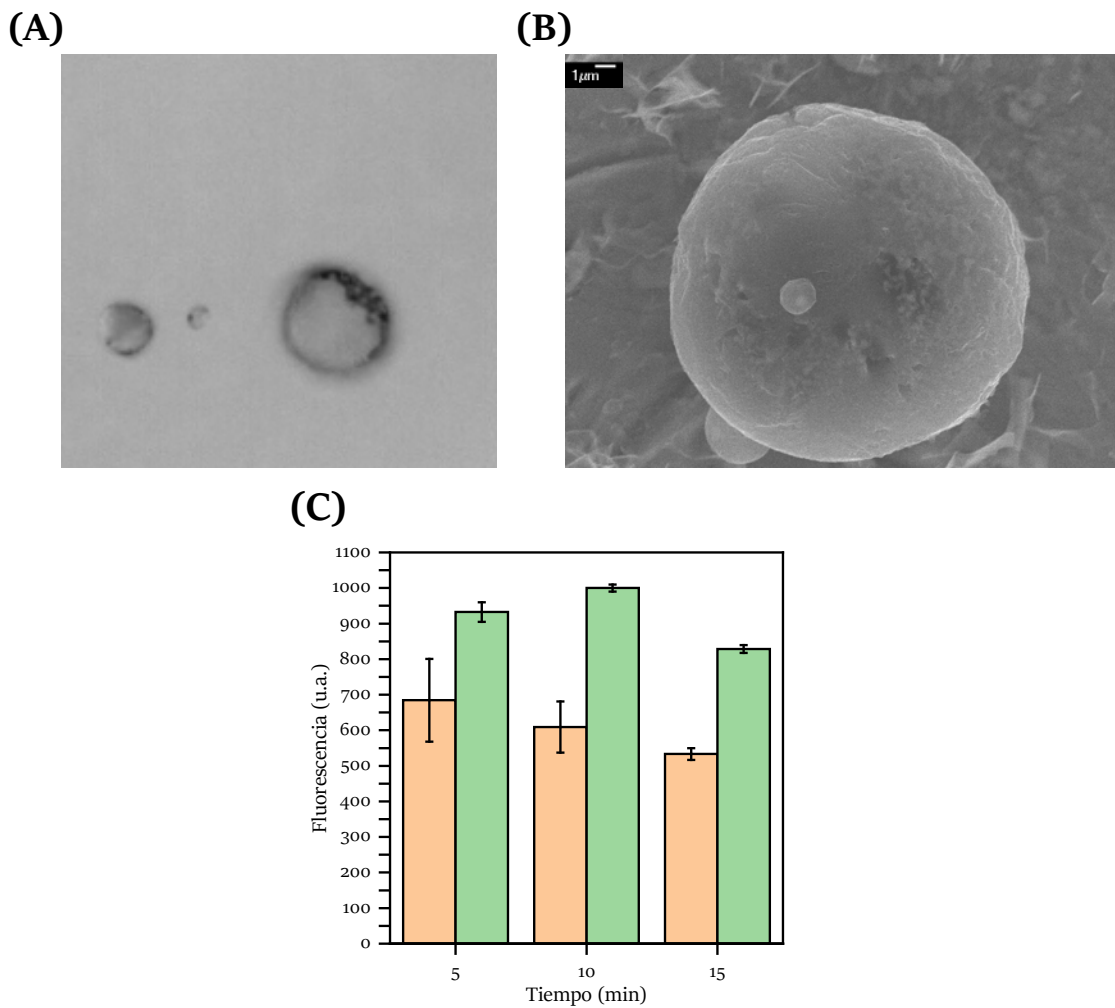


Figura 71. (A) Imagen de los micromotores esféricos Janus de PCL, se observa una zona más oscura que corresponde a las NPs agregadas. (B) Imagen SEM de la superficie polimérica de los micromotores. (C) Señales de fluorescencia medidas para los micromotores de PCL-FK506 en ausencia (naranja) y en presencia (verde) de 4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FK506 en PBS, junto a 5.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína fluorescente FKBP1A-EmGFP.

4.3.2. Tipo de movimiento de los micromotores

Se evaluó la influencia de la propulsión autónoma del micromotor y la mezcla mejorada de fluidos en las características analíticas del método. Para ello se realizó el ensayo en ausencia (B_0) y en presencia de $4.8 \mu\text{g/mL}$ de FK506 (B_1) utilizando diferentes métodos de propulsión: a) estático, b) agitación mecánica, c) propulsión magnética, d) propulsión mediante burbujas.

En los ensayos realizados en el modo de propulsión por burbujas se emplearon micromotores Janus que contenían nanopartículas de Pt,⁵¹⁹ responsables de la reacción catalítica, junto con H_2O_2 como combustible. Los micromotores se resuspendieron en una disolución que contenía el combustible, y tras una incubación previa de 10 min para que comenzaran a moverse, se mezclaron con la proteína fluorescente y el analito. Se empleó una concentración final de H_2O_2 de 7.5%, cantidad mínima que permitía la propulsión de los micromotores.

En la **Figura 72A** se muestran las imágenes de fluorescencia obtenidas con los micromotores propulsados con diferentes tipos de movimiento tras 15 min de ensayo, en las que se muestra su efecto sobre la señal analítica. Las señales de fluorescencia (**Figura 72B**) obtenidas a partir de las imágenes muestran que, como era de esperar, en ausencia de agitación la fluorescencia del medio no varía, ya que la interacción está limitada por la difusión. Por otro lado, en los ensayos realizados con agitación mecánica, o con propulsión magnética, se observa una diferencia significativa en las señales de fluorescencia obtenidas en ausencia y en presencia del analito, aumentando al emplear propulsión magnética. En el caso de los micromotores catalíticos propulsados por burbujas, se observa una disminución de la fluorescencia de la proteína debida al empleo del H_2O_2 , que dado su carácter oxidante favorece la desnaturalización de la proteína recombinante.⁵⁴² Por todo ello, se seleccionó una propulsión magnética como la mejor alternativa para la medida con los micromotores, ya que permitía obtener una mayor sensibilidad (menor B_0/B para la misma concentración de FK506).

Para ajustar la velocidad de las partículas Janus magnéticas, se capturaron fragmentos de video de los micromotores (16 fotogramas por segundo) con los diferentes

tipos de propulsión. El análisis de los vídeos con el software NIS element, permitió calcular el desplazamiento cuadrático medio para cada partícula en función del tiempo (**Figura 72C**), obteniéndose una mayor velocidad al emplear una frecuencia de agitación de 6.2 Hz.

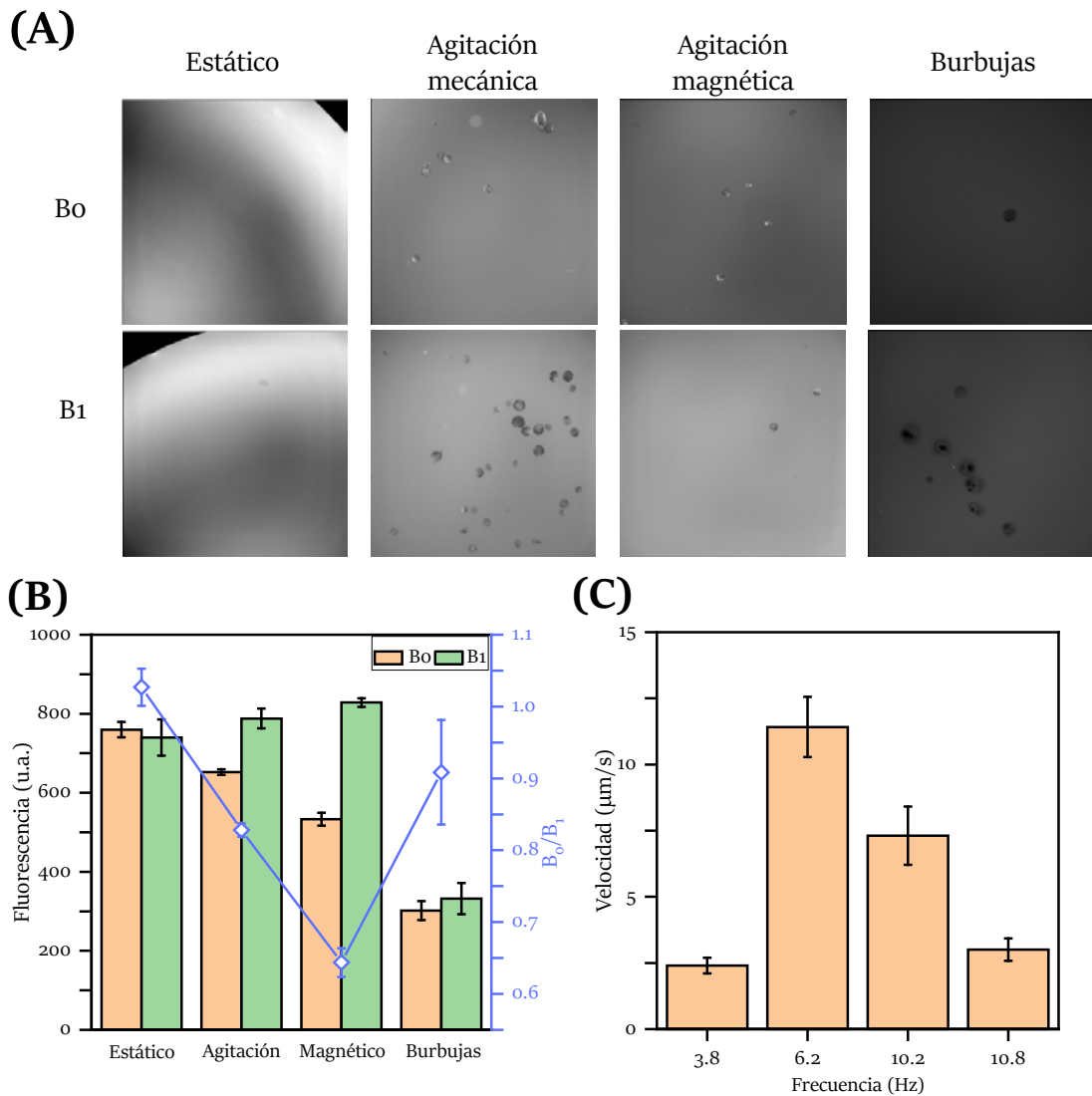


Figura 72. Efecto del tipo de propulsión empleada en el bioensayo sobre la respuesta de los micromotores. **(A)** Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los ensayos llevados a cabo en ausencia (B_0) y presencia de $4.8 \mu\text{g/mL}$ FK506 (B_1) para los diferentes tipos de propulsión, empleando 6300 micromotores por ensayo y una concentración de proteína fluorescente de $6 \mu\text{g/mL}$. λ_{exc} : 480/30 nm, espejo dicróico: 505 nm, λ_{em} : 535/45 nm. **(B)** Intensidades de fluorescencia obtenidas para los ensayos llevados a cabo con diferentes tipos de propulsión en presencia y ausencia del FK506. **(C)** Perfil de velocidad de los micromotores PCL(NP)-FK506 en PBS propulsados magnéticamente con diferentes frecuencias de rotación.

4.3.3. Selección de la cantidad de micromotores y tiempo de incubación

Una vez seleccionadas las variables óptimas de propulsión para el ensayo competitivo con los micromotores magnéticos, se evaluó la influencia de la cantidad de micromotores en la sensibilidad del ensayo. Las medidas se realizaron en ausencia (B_0) y presencia de 4.8 $\mu\text{g/mL}$ FK506 (B_1) y adicionando diferentes cantidades de micromotores (3150, 6300 y 12600 micromotores/ensayo).

En la **Figura 73** se muestra la variación de la relación B_0/B_1 obtenida para las diferentes concentraciones de micromotores ensayadas, a diferentes tiempos. Se observa un aumento de la sensibilidad del ensayo al aumentar el tiempo de reacción y el número de micromotores.

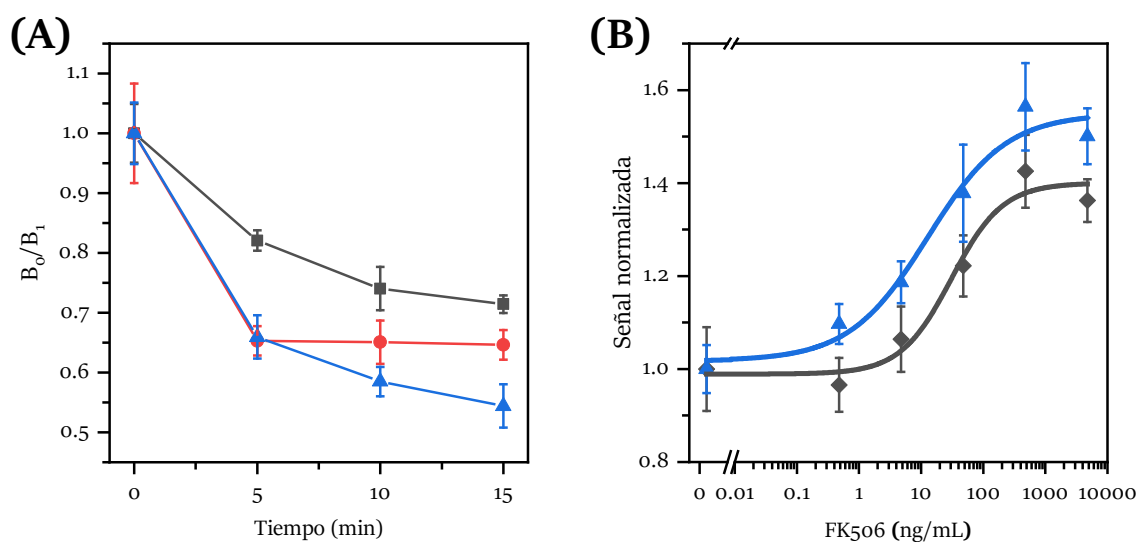


Figura 73. (A) Influencia del número de micromotores Janus magnéticos funcionalizados con FK506 (● 3150, ■ 6300 y ▲ 12600 micromotores/ensayo) y del tiempo de incubación en la detección de FK506 en PBS. (B) Influencia del tiempo de incubación en el bioensayo. Las curvas de calibrado corresponden a tiempos de incubación de 5 min (◆) y 15 min (▲). [FKBP1A-EmGFP] = 6 $\mu\text{g/mL}$; B_0 = 0 ng/mL FK506; B_1 = 4.8 $\mu\text{g/mL}$ FK506. λ_{exc} : 480/30 nm, espejo dicróico: 505 nm, λ_{em} : 535/45 nm. Los resultados se representan como la media de las señales \pm el error estándar de la media ($n = 3$).

El tiempo de incubación tiene un efecto directo en las características analíticas del método. Si bien los ensayos heterogéneos están limitados por la difusión de las moléculas hacia el soporte, el empleo de micromotores acelera este proceso gracias a la agitación que se produce en su microentorno, favoreciendo el mezclado de los reactivos.

Se evaluaron tres tiempos de incubación diferentes (5, 10 y 15 min). Para ello, se llevaron a cabo ensayos competitivos empleando 6 $\mu\text{g/mL}$ de FKBP1A-EmGFP, 12600 micromotores y diferentes concentraciones de FK506, comprendidas entre 0 y 4.8 $\mu\text{g/mL}$. Como se observa en la **Figura 73B**, al aumentar el tiempo de incubación hasta 15 min se consigue una mayor sensibilidad para la determinación del inmunosupresor, con valores de IC_{50} de 31 ng/mL y 13 ng/mL, para para 5 y 15 min, respectivamente.

Por ello, se seleccionaron como parámetros óptimos para las siguientes medidas una cantidad de 12600 micromotores por ensayo y un tiempo de incubación de 15 min.

4.3.4. Caracterización analítica

Una vez optimizados los parámetros del ensayo, se midieron las curvas de calibrado empleando disoluciones patrón de FK506 en PBST en el intervalo de 0 a 500 ng/mL.

En la **Figura 74**, se muestra la curva de calibrado ajustando las señales normalizadas a una ecuación logística de cuatro parámetros. El DR, intervalo de concentraciones que producen entre un 20% y un 80% de la señal respecto al blanco, está comprendido entre 2 y 90 ng/mL. El LOD, calculado como la media del blanco \pm 3 veces la desviación estándar del blanco, corresponde a un valor de 0.8 ng/mL. El valor IC_{50} corresponde a una concentración de FK506 de 12 ng/mL.

Este ensayo mejora la sensibilidad del método descrito en el apartado 4.2 empleando la misma proteína fluorescente, aunque presenta menor reproducibilidad entre medidas ($\text{RSD}_{\text{media}}$: 16% vs $\text{RSD}_{\text{media}}$: 10%). Esto se debe, por un lado, a que la mezcla de fluidos es mucho más eficaz cuando se emplean los micromotores, lo que favorece la competición entre el analito libre y el inmovilizado sobre el micromotor por el sitio de reconocimiento de la proteína FKBP1A-EmGFP. Por otro lado, el formato de medida utilizado en este caso está basado en el principio de medida de los sensores de fluorescencia “*turn-on*”, donde se mide el incremento de la señal al aumentar la concentración de analito presente en la muestra, lo que permite monitorizar pequeñas variaciones producidas de la señal, debidas a bajas concentraciones, en relación con un fondo “oscuro”, aumentando la sensibilidad.⁵⁴³

Comparado con inmunoensayos y kits comerciales empleados para la cuantificación de FK506, el bioensayo muestra una sensibilidad comparable con los ensayos descritos hasta el momento.^{140,255,261,263} Además, muestra un DR más amplio, cumpliendo los requerimientos médicos para la detección y cuantificación de FK506.

La reactividad cruzada se determinó comparando la curva de calibrado obtenida para el FK506 con la correspondiente al inmunosupresor MPA, administrado habitualmente junto con el FK506 en el tratamiento de pacientes trasplantados. En la **Figura 74** se puede observar que no existe reactividad cruzada con el MPA en el intervalo de concentraciones ensayadas (concentración total de MPA en sangre: 1.9 – 4 µg/mL). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el apartado 4.2.2.7 empleando partículas magnéticas.

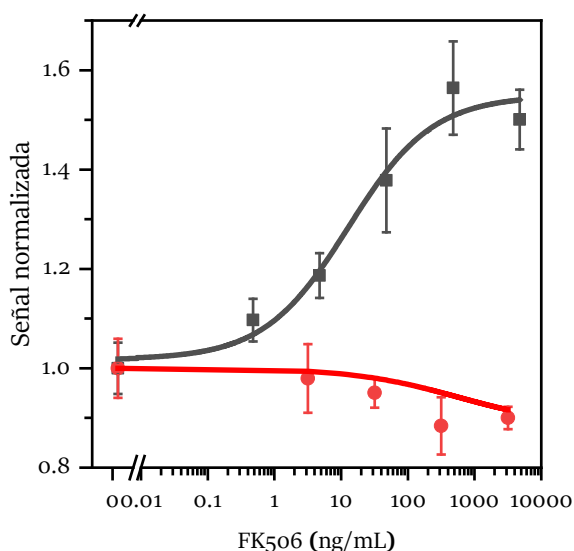


Figura 74. Curvas de calibrado correspondientes al bioensayo para FK506 (■, n = 3, 6 puntos) y MPA (●, n = 3, 5 puntos) en PBS, empleando los micromotores magnéticos Janus de PCL modificados con FK506. Los resultados se representan como la media de las señales ± el error estándar de la media (n = 3).

5. Conclusiones

Se han sintetizado proteínas recombinantes fluorescentes de FKBP1A fusionadas con EmGFP y mOrange2. Esta aproximación ofrece una alternativa interesante a la conjugación química para el desarrollo de métodos analíticos, ya que permite la producción ilimitada del elemento de reconocimiento a relativamente bajo coste y evitando variaciones entre lotes.

Las proteínas recombinantes expresadas muestran espectros de fluorescencia similares a los de la proteína sin fusionar, confirmando la correcta expresión y plegamiento del dominio fluorescente. Las interacciones entre el receptor recombinante y el inmunosupresor, FK506, se evaluaron mediante QCM, obteniéndose las pseudo constantes de unión que fueron inferiores a las descritas para el FKBP1A nativo en disolución. Las diferencias entre las constantes de las cuatro proteínas fluorescentes se atribuyen a la accesibilidad del analito al sitio de unión debida a las diferentes conformaciones que adoptan sobre la superficie sensora.

Los resultados obtenidos demuestran la idoneidad de estas construcciones, como alternativa a los anticuerpos empleados en los ensayos convencionales, para el desarrollo de métodos analíticos para la determinación del inmunosupresor. De las diferentes construcciones ensayadas, la proteína FKBP1A-EmGFP es la que permite determinar FK506 con mayor sensibilidad. La menor sensibilidad obtenida con el resto de proteínas recombinantes sintetizadas puede deberse a impedimentos estéricos que imposibiliten el correcto reconocimiento del analito en el sitio de unión de la FKBP1A, o a un incorrecto plegamiento de la región de reconocimiento.

El bioensayo optimizado empleando partículas magnéticas, permite la cuantificación del FK506 total en muestras de sangre entera, cumpliendo con las especificaciones médicas para la detección y cuantificación del inmunosupresor. Se ha aplicado de manera satisfactoria al análisis de muestras reales de pacientes trasplantados tratados con el fármaco. Los resultados obtenidos se han comparado favorablemente con los obtenidos por un laboratorio externo empleando el ensayo comercial CMIA (ARCHITECT iSystem, Abbott). Una de las ventajas del método optimizado es que no se

observa efecto matriz en muestras sanguíneas. El protocolo optimizado permite el análisis simultáneo de 96 muestras en 45 min empleando un lector de placas.

Para mejorar las características analíticas del método, se ha desarrollado otro bioensayo empleando micromotores, que mejoran la mezcla de fluidos y aceleran las interacciones entre la proteína de reconocimiento y el analito. Los mejores resultados se obtuvieron empleando micromotores Janus de PCL con agitación magnética que permiten igualar, o mejorar, la sensibilidad de los ensayos comerciales basados en anticuerpos.

Los resultados obtenidos con ambos métodos para el análisis de inmupresores en sangre, como alternativa al empleo de inmunoensayos son muy prometedores. Además, al basarse en el uso de partículas magnéticas funcionalizadas puede aplicarse fácilmente al desarrollo de métodos lab-on-a-chip para medidas *in situ*.

VIII. *FINAL CONCLUSIONS*

The most relevant results of this Doctoral Thesis are listed below:

1. Development of fluorescence polarization immunoassays for the analysis of immunosuppressants in blood samples

This work addressed the development of new luminescent derivatives of the immunosuppressants FK506, CsA, and MPA, for their application in competitive immunoassays, based on fluorescence polarization, for the analysis of these ISDs in serum and plasma samples.

- Among the novel fluorescent conjugates tested, synthesized by other colleagues of our research group, only that corresponding to MPA labeled with a Nile Blue derivative allowed the development of an analytical method with excellent sensitivity and robustness for the determination of the free form of the drug in real world samples.
- Several parameters affecting the sensitivity and reproducibility of the assay were optimized, namely the concentration of immunoreagents (1 nmol/L MPA-AO and 5 µg/mL Ab anti-MPA), the assay buffer (PBST) and the incubation time (20 min), in order to achieve the best sensitivity and reproducibility for the determination of MPA in blood samples.
- The optimized method shows a LOD of 0.8 ng/mL and a linear response interval of 1.7 – 39 ng/mL in PBST, which allows the quantification of the free fraction of MPA in blood samples from transplanted patients. The results of the optimized assay are comparable, or improve, the analytical performance of other methods, as well as commercial kits, reported in the literature for the analysis of this compound in the selected samples.
- No cross-reactivity was observed against other immunosuppressants such as FK506 and CsA, usually co-administered with MPA to avoid organ rejection. Similarly, cross-reactivity for the secondary metabolite MPAG was negligible, proving the selectivity of the assay.
- No matrix effect is observed when ultrafiltrated serum or plasma samples are diluted at least 1/4 (v/v) in PBST; therefore, is possible to measure directly on the external calibration curve measured in buffer.

- The immunoassay has been successfully applied to the analysis of free MPA in blank serum samples spiked with the immunosuppressant and to the analysis of blood from a transplanted patient treated with MPA in combination with FK506. The results have been validated by RRLC-DAD.
- The optimized FPIA allows the analysis of 96 samples in just 20 min using a microplate reader.

2. Development of bioassays for the determination of FK506 using the FKBP1A receptor as an alternative to the use of Abs

2.1. Synthesis and expression of fluorescent proteins

- Four fluorescent fusion proteins have been designed by assembling the genes corresponding to the human FK506 receptor, FKBP1A, and the inserts of the fluorescent proteins EmGFP and mOrange2.
- The expressed fusion proteins show absorption and emission spectra similar to those of the native fluorescent proteins, confirming the correct expression and folding of the fluorescent proteins.
- The interactions between the fluorescent recombinant receptor and FK506 were evaluated using QCM, obtaining the pseudo binding constants. The calculated values are lower than those described in the literature for the native FKBP1A in solution. This behavior can be attributed to the fact that the protein is immobilized on the chip surface and its possible conformations are limited. Therefore, the calculated K_d values are not directly comparable with those measured in solution. On the other hand, the differences between the dissociation constants for the four fluorescent recombinant proteins indicate that they adopt different conformations on the sensing surface, which affects the accessibility of the analyte to the binding site.
- The replacement of Abs by the recombinant receptor FKBP1A-EmGFP for the development of bioassays allows, among other advantages, the availability of an unlimited amount of the recognition element at relatively low cost, avoiding batch-

to-batch variations and without the need of experimental animals for their production.

2.2. Application of fluorescent fusion proteins to the development of bioassays using magnetic particles

- The recombinant fluorescent proteins FKBP1A-mOrange2, mOrange2-FKBP1A, FKBP1A-EmGFP and EmGFP-FKBP1A produced *de novo* were evaluated to determine which of them allowed the development of the most sensitive bioassay. The mOrange2-tagged fusion proteins show little affinity for FK506, and the dynamic ranges are very narrow. However, the FKBP1A receptor fused to EmGFP binds to the drug, regardless of whether the fluorescent protein is placed at the C-terminal or N-terminal end of the receptor.
- Of the different constructs tested, the use of FKBP1A with EmGFP located at its C-terminal end (FKBP1A-EmGFP) yields more reproducible results; therefore, it was selected for the development of the bioassay.
- Several parameters that influence the sensitivity of the bioassay have been optimized, including protein concentration (5.25 µg/mL), concentration of FK506-functionalized magnetic particles (7 µg/well), assay buffer (PBST), incubation time (25 + 15 min) and temperature (18 °C).
- The optimized method is characterized by a LOD of 3 ng/mL and a dynamic range between 5 and 70 ng/mL, allowing the quantification of FK506 in whole blood samples. These values are slightly higher than those obtained with some commercial antibody-based kits. Nevertheless, the analytical characteristics of the assay allow the quantification of the immunosuppressant at the concentrations required in clinical analysis.
- No cross-reactivity was observed in the presence of MPA. Sirolimus shows a cross-reactivity of 38%, which is justified considering that this compound is also recognized by FKBP1A in the human body.

- The optimized sample treatment for the analysis of whole blood samples allows avoiding the matrix effect; therefore the drug can be quantified directly using an external calibration plot in buffer.
- The bioassay has been successfully applied to the analysis of real world samples from transplanted patients treated with the drug. The results compared favorably with those obtained by an external laboratory using the commercial CMIA assay (ARCHITECT iSystem, Abbott).

2.3. Application of fluorescent fusion proteins to the development of bioassays using micromotors

- Different types of micromotors have been synthesized, namely catalytic tubular and Janus type, for their functionalization with an acid derivative of FK506. The Janus type micromotors based on PCL, yield the best results in terms of reproducibility for the development of the bioassay for the determination of FK506.
- The main parameters influencing the sensitivity of the bioassay for the analysis of tacrolimus have been evaluated and optimized, namely: the type of propulsion (magnetic), the concentration of micromotors (12,600 per assay) and the incubation time (15 min) between the micromotor and the sample.
- The optimized method improves the LOD obtained previously using the same fusion protein (FKBP1A-EmGFP) (0.8 ng/mL vs. 3 ng/mL) and increases the dynamic range in PBS (2 – 90 ng/mL vs. 5 – 70 ng/mL), allowing the quantification of FK506 in whole blood samples. The reproducibility using the micromotors is, however, lower than that obtained with the magnetic particle-based bioassay (mean RSD: 16% vs. mean RSD: 10%) probably as a result of the complexity of the measuring system, which is higher when using the micromotors.
- No cross-reactivity against MPA is observed, demonstrating the selectivity of the assay.
- The application of the optimized bioassay to the analysis of the immunosuppressant in biological samples is currently under evaluation.

The results obtained prove the usefulness and applicability of the synthesized fusion proteins as an alternative to Abs for the development of analytical methods for the analysis of FK506. Moreover, we propose that the optimized assays could be applied to the development of lab-on-a-chip methods for *in situ* measurements.

IX. CONCLUSIONES FINALES

Los resultados más relevantes de la presente Tesis Doctoral se resumen a continuación:

1. Desarrollo de un inmunoensayo basado en medidas de polarización de fluorescencia para la detección de inmunosupresores en suero sanguíneo

En este trabajo se abordó el desarrollo de nuevos derivados luminiscentes de los inmunosupresores FK506, CsA y MPA, para su aplicación en ensayos competitivos basados en polarización de fluorescencia, para la determinación de estos fármacos en muestras de suero y plasma.

- De los distintos conjugados fluorescentes evaluados, sintetizados por primera vez en el grupo de investigación, tan solo el correspondiente al MPA marcado con un derivado del Azul del Nilo permitió el desarrollo de un método analítico, con la sensibilidad necesaria, para la determinación de la forma libre del fármaco en muestras reales.
- Se han optimizado varios parámetros que afectan a la sensibilidad del ensayo concretamente, la concentración de inmunorreactivos (1 nmol/L MPA-AO y 5 µg/mL Ab anti-MPA), el tampón de ensayo (PBST) y el tiempo de incubación (20 min), a fin de conseguir la máxima sensibilidad y la mayor reproducibilidad posible para la determinación del inmunosupresor MPA en muestras de sangre.
- El método optimizado presenta un LOD de 0.8 ng/mL y un intervalo de respuesta lineal de 1.7 - 39 ng/mL en PBST, lo que permite la cuantificación de la fracción libre de MPA en muestras de sangre de pacientes trasplantados. Los resultados obtenidos igualan o mejoran las prestaciones analíticas de los descritos en bibliografía para la determinación de este compuesto, así como las de métodos disponibles comercialmente.
- No se observó reactividad cruzada frente a otros inmunosupresores (FK506, CsA) co-administrados habitualmente con MPA para evitar rechazos. Del mismo modo, la reactividad cruzada observada para el metabolito secundario MPAG fue nula, lo que demuestra la selectividad del ensayo.

- No se observa efecto de matriz cuando las muestras de suero o plasma ultrafiltradas se diluyen al menos 1/4 (v/v) en PBST, de forma que es posible medir directamente en la curva de calibrado externa realizada en dicho buffer de trabajo.
- El inmunoensayo se ha aplicado de forma satisfactoria al análisis de MPA libre en muestras de suero enriquecidas artificialmente con el inmunosupresor y para el análisis de sangre de un paciente trasplantado, tratado con MPA en combinación con FK506. Los resultados se han validado mediante RRLC-DAD.
- El FPIA desarrollado permite el análisis de 96 muestras en tan solo 20 min empleando un lector de microplacas.

2. Desarrollo de bioensayos para la determinación de FK506 empleando el receptor FKBP1A como alternativa al uso de Abs

2.1. Síntesis y expresión de proteínas fluorescentes

- Se han diseñado cuatro proteínas fluorescentes de fusión mediante el ensamblaje de los genes correspondientes al receptor natural de FK506, FKBP1A, y los insertos de las proteínas fluorescentes EmGFP y mOrange2.
- Las proteínas de fusión expresadas muestran espectros de absorción y emisión similares a los de las proteínas fluorescentes nativas, confirmando la correcta expresión y plegamiento del dominio fluorescente.
- Las interacciones entre el receptor recombinante y el FK506 se evaluaron empleando una QCM, obteniéndose las pseudo constantes de unión. Los valores calculados son inferiores a los descritos en bibliografía para el FKBP1A nativo en disolución. Este comportamiento puede atribuirse a que la proteína se encuentra inmovilizada sobre la superficie del chip y sus conformaciones están restringidas, por lo que los valores de K_d obtenidos no son directamente comparables con los medidos en disolución. Por otra parte, las diferencias obtenidas entre las constantes de disociación para las cuatro proteínas recombinantes fluorescentes se justifican considerando que adoptan diferentes conformaciones sobre la superficie sensora, lo que se traduce en una distinta accesibilidad del analito al sitio de unión.

- La sustitución de los Abs por el receptor recombinante FKBP1A-EmGFP para el desarrollo de bioensayos permite, entre otras ventajas, disponer de una cantidad ilimitada del elemento de reconocimiento a relativamente bajo coste, evitando variaciones entre lotes y sin la necesidad de emplear animales de experimentación para su producción.

2.2. Aplicación de las proteínas de fusión fluorescentes al desarrollo de bioensayos empleando partículas magnéticas

- Se han evaluado las proteínas fluorescentes recombinantes FKBP1A-mOrange2, mOrange2-FKBP1A, FKBP1A-EmGFP y EmGFP-FKBP1A, producidas *de novo* en la presente Tesis Doctoral, para determinar cuál de ellas permitía desarrollar el bioensayo más sensible. Las proteínas de fusión marcadas con mOrange2 muestran poca afinidad por el FK506 y los intervalos dinámicos de respuesta son muy estrechos. Sin embargo, el receptor FKBP1A fusionado a EmGFP reconoce de forma significativa al fármaco, independientemente de si la proteína fluorescente se dispone en el extremo C-terminal o N-terminal del mismo.
- De las diferentes construcciones ensayadas, el uso de la FKBP1A con la EmGFP situada en su extremo C-terminal (FKBP1A-EmGFP) permite obtener resultados más reproducibles, por lo que fue seleccionada para el desarrollo del bioensayo.
- Se han optimizado varios parámetros que influyen en la sensibilidad del bioensayo, concretamente: la concentración de proteína (5.25 µg/mL), concentración de partículas magnéticas funcionalizadas con FK506 (7 µg/pocillo), el tampón de ensayo (PBST), el tiempo de incubación (25 + 15 min) y la temperatura (18 °C).
- El método optimizado se caracteriza por un LOD de 3 ng/mL y un intervalo dinámico entre 5 y 70 ng/mL, permitiendo la cuantificación de FK506 en muestras de sangre entera. Estos valores son ligeramente superiores a los obtenidos en algunos de los kits comerciales basados en anticuerpos. No obstante, las características analíticas del ensayo son adecuadas para la determinación del fármaco en muestras clínicas.

- No se observó reactividad cruzada frente al MPA. El sirolimus presenta una reactividad cruzada del 38%, lo cual se justifica teniendo en cuenta que este compuesto también es reconocido por el FKBP1A en el cuerpo humano.
- El tratamiento de muestra optimizado para el análisis de muestras de sangre entera permite eliminar el efecto matriz, de forma que podemos cuantificar el fármaco utilizando directamente el calibrado en buffer.
- El bioensayo se ha aplicado de manera satisfactoria al análisis de muestras reales de pacientes trasplantados tratados con el fármaco. Los resultados obtenidos se han comparado favorablemente con los obtenidos por un laboratorio externo empleando el ensayo comercial CMIA (ARCHITECT iSystem, Abbott).

2.3. Aplicación de las proteínas de fusión fluorescentes al desarrollo de bioensayos empleando micromotores

- Se han sintetizado micromotores de distinta naturaleza, concretamente tubulares catalíticos y de tipo Janus, para su funcionalización con un derivado ácido del FK506. Los micromotores de tipo Janus obtenidos mediante el empleo de PCL, son los que han permitido obtener mejores resultados en términos de reproducibilidad para el desarrollo del bioensayo para la determinación de FK506.
- Se han evaluado y optimizado los principales parámetros que influyen en la sensibilidad del bioensayo para el análisis de tacrolimus, concretamente: el tipo de propulsión (magnética), la concentración de micromotores (12.600 por ensayo) y el tiempo de incubación (15 min) entre el micromotor y la muestra.
- El método optimizado mejora el LOD obtenido anteriormente empleando la misma proteína de fusión (FKBP1A-EmGFP) (0.8 ng/mL vs 3 ng/mL) ampliándose el intervalo de respuesta lineal en PBS (2 – 90 ng/mL vs 5 – 70 ng/mL) lo que facilita la cuantificación de FK506 en muestras de sangre entera. La reproducibilidad de las medidas empleando los micromotores es, sin embargo, menor que las obtenida con el bioensayo basado en partículas magnéticas (RSD_{media} : 16% vs RSD_{media} : 10%) probablemente debido a la complejidad del

sistema de medida, que es mayor que en el caso del ensayo empleando los micromotores.

- No se observa reactividad cruzada frente al MPA, demostrando la selectividad del ensayo.
- Actualmente se está evaluando la aplicación del bioensayo optimizado al análisis del inmunosupresor en muestras biológicas.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral demuestran la utilidad y aplicabilidad de las proteínas de fusión sintetizadas, como alternativa a los Abs para el desarrollo de métodos analíticos para la determinación del FK506. Por otra parte, los ensayos optimizados podrían aplicarse al desarrollo de métodos lab-on-a-chip para medidas *in situ*.

X. FINAL REMARKS

In addition to the bioassays optimized in this Doctoral Thesis for the determination of immunosuppressants in samples from organ transplant patients, the PhD student has evaluated other alternative routes for the development of biosensors and bioassays for the determination of these compounds. The results corresponding to these studies have not been included in this Thesis, but some of them are very promising and have opened up new lines of work in the research group that are currently being explored. For example, she has worked on the synthesis and functionalization of a BTL2 lipase protein from *Bacillus thermocatenuatus*, to be used as a tool to facilitate the immobilization of ISDs on hydrophobic sensor surfaces, generating 3D surfaces that can be applied in the preparation of sensor arrays for multiplexing on POC devices.

XI. CONSIDERACIONES FINALES

Además de los bioensayos optimizados en la presente Tesis Doctoral para la determinación de inmunosupresores en muestras de pacientes sometidos a un trasplante de órganos, en los últimos años la doctoranda ha evaluado otras vías alternativas para el desarrollo de biosensores y bioensayos para la determinación de estos compuestos. Los resultados correspondientes a estos estudios no se han incluido en la memoria de la Tesis pero algunos de ellos son muy prometedores y han permitido abrir nuevas líneas de trabajo en el grupo de investigación que se están explorando en la actualidad. Por ejemplo, la síntesis y modificación de la proteína lipasa BTL2 de *Bacillus thermocatenuatus*, para utilizarla en la inmovilización de los ISDs sobre superficies sensoras hidrofóbicas. El empleo de la lipasa permite la generación de superficies 3D con grupos funcionales de distinta naturaleza para la preparación de matrices de sensores.

XII. REFERENCIAS

- (1) Borel, J. F. Immunosuppression. En *Encyclopedia of Immunology*; Delves, P. J., Ed.; Elsevier: Oxford, 1998; pp 1349–1353. <https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0344>.
- (2) Transplantation Immunology. En *Immunology Guidebook*; Cruse, J. M., Lewis, R. E., Wang, H., Eds.; Academic Press: San Diego, 2004; pp 475–486. <https://doi.org/10.1016/B978-012198382-6/50042-X>.
- (3) Sádaba, B. Monitorización y efectos secundarios de los inmunosupresores en el trasplante. *An. Sist. Sanit. Navar.* **2006**, *29*, 207–218.
- (4) Faassen, F.; Kelder, J.; Lenders, J.; Onderwater, R.; Vromans, H. Physicochemical Properties and Transport of Steroids Across Caco-2 Cells. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 177–186. <https://doi.org/10.1023/A:1022210801734>.
- (5) Hardy, R. S.; Raza, K.; Cooper, M. S. Therapeutic Glucocorticoids: Mechanisms of Actions in Rheumatic Diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2020**, *16*, 133–144. <https://doi.org/ste>.
- (6) Dasgupta, A. Limitations of Immunoassays Used for Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressants. En *Personalized Immunosuppression in Transplantation*; Oellerich, M., Dasgupta, A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2016; pp 29–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800885-0.00002-3>.
- (7) Steiner, R. W.; Awdishu, L. Steroids in Kidney Transplant Patients. *Semin. Immunopathol.* **2011**, *33*, 157–167. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0259-7>.
- (8) Ho, S.; Clipstone, N.; Timmermann, L.; Northrop, J.; Graef, I.; Fiorentino, D.; Nourse, J.; Crabtree, G. R. The Mechanism of Action of Cyclosporin A and FK506. *J. Clin. Immunol. Immunopathol.* **1996**, *80*, S40–S45. <https://doi.org/10.1006/clin.1996.0140>.
- (9) Lim, M. A.; Bloom, R. D. Immunosuppressive Therapy. En *Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation*; Himmelfarb, J., Ikizler, T. A., Eds.; Elsevier: Philadelphia, 2019; pp 591–604.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52978-5.00038-0>.
- (10) Diehl, R.; Ferrara, F.; Müller, C.; Dreyer, A. Y.; McLeod, D. D.; Fricke, S.; Boltze, J. Immunosuppression for in Vivo Research: State-of-the-Art Protocols and Experimental Approaches. *Cell Mol. Immunol.* **2017**, *14*, 146–179. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.39>.
- (11) Salido-Vallejo, R.; Garnacho-Saucedo, G.; Vélez, A. Bases moleculares y aplicaciones farmacológicas de la vía de mTOR en dermatología. *Actas Dermosifiliogr.* **2016**, *107*, 379–390. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2015.12.006>.
- (12) European Medicines Agency. Rapamune (Sirolimus)-EMA/H/C/000273, 2001.
- (13) European Medicines Agency. Votubia (Everolimus)-EMA/H/C/002311, 2011.
- (14) European Medicines Agency. Torisel (Temsilimus)-EMA/H/C/000799, 2009.
- (15) Cytostatic and Immunosuppressant Drugs. En *Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*; Aronson, J. K., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2006; pp 1035–1044. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451005-2/01028-7>.
- (16) Humar, A.; Dunn, D. L. Transplantation. En *Schwartz's Manual of Surgery*; Brunicardi, F. C., Ed.; McGRAW-HILL: New York, 2006; pp 216–244.
- (17) Dhanireddy, K. K.; Xu, H.; Mannon, R. B.; Hale, D. A.; Kirk, A. D. The Clinical Application of Monoclonal Antibody Therapies in Renal Transplantation. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2004**, *9*, 23–37. <https://doi.org/10.1517/14728214.9.1.23>.

- (18) Verdura, B.; Xiol, X. Nuevos inmunosupresores: anticuerpos monoclonales en el trasplante hepático. *GH Continuada* **2006**, *5*, 279–282. [https://doi.org/10.1016/S1578-1550\(06\)74327-3](https://doi.org/10.1016/S1578-1550(06)74327-3).
- (19) Chiba, K. Discovery of Fingolimod Based on the Chemical Modification of a Natural Product from the Fungus, *Isaria Sinclairii*. *J. Antibiot.* **2020**, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0351-0>.
- (20) Trevillian, P. Immunosuppressants - Clinical Applications. *Aust. Prescr.* **2006**, *29*, 102–108. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2006.065>.
- (21) Singh, V. Sushruta: The Father of Surgery. *Natl. J. Maxillofac. Surg.* **2017**, *8*, 1–3. https://doi.org/10.4103/njms.NJMS_33_17.
- (22) Petechuk, D. *Organ Transplantation*; Greenwood Publishing Group, 2006.
- (23) Barker, C. F.; Markmann, J. F. Historical Overview of Transplantation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2013**, *3*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014977>.
- (24) Krüger, L.; Kristiansen, Y.; Reuber, E.; Möller, L.; Laue, M.; Reimer, C.; Denner, J. A Comprehensive Strategy for Screening for Xenotransplantation-Relevant Viruses in a Second Isolated Population of Göttingen Minipigs. *Viruses* **2020**, *12*, 38. <https://doi.org/10.3390/v12010038>.
- (25) Denner, J. Recent Progress in Xenotransplantation, with Emphasis on Virological Safety. *Ann. Transplant.* **2016**, *21*, 717–727. <https://doi.org/10.12659/AOT.900531>.
- (26) ONT-WHO Global Observatory on Donation and Transplantation <http://www.transplant-observatory.org/>.
- (27) Metz, D. K.; Holford, N.; Kausman, J. Y.; Walker, A.; Cranswick, N.; Staatz, C. E.; Barraclough, K. A.; Ierino, F. Optimizing Mycophenolic Acid Exposure in Kidney Transplant Recipients: Time for Target Concentration Intervention. *Transplantation* **2019**, *103*, 2012–2030. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002762>.
- (28) Sawinski, D.; Goral, S. Diagnosis and Therapy of Graft Dysfunction. En *Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation*; Himmelfarb, J., Ikizler, T. A., Eds.; Elsevier: Philadelphia, 2019; pp 605-620.e4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52978-5.00039-2>.
- (29) Van Dyke, K. Transplantation Rejection. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05377-0>.
- (30) *Personalized Immunosuppression in Transplantation: Role of Biomarker Monitoring and Therapeutic Drug Monitoring*; Oellerich, M., Dasgupta, A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2016.
- (31) Taylor, A. W. Ocular Immune Privilege and Transplantation. *Front. Immunol.* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00037>.
- (32) Han, D.; Liu, Z.; Yan, K. Immunology of the Testis and Privileged Sites. In *Encyclopedia of Immunobiology*; Ratcliffe, M. J. H., Ed.; Academic Press: Oxford, 2016; pp 46–53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.19009-5>.
- (33) Wang, X. Bioartificial Organ Manufacturing Technologies. *Cell Transplant.* **2019**, *28*, 5–17. <https://doi.org/10.1177/0963689718809918>.

- (34) Stevens, S. Synthetic Biology in Cell and Organ Transplantation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029561>.
- (35) Splendiani, G.; Cipriani, S.; Vega, A.; Casciani, C. U. Artificial Organs and Transplantation. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **2003**, *31*, 91–96. <https://doi.org/10.1081/BIO-120020163>.
- (36) Famulari, A.; De Simone, P.; Verzaro, R.; Iaria, G.; Poliseti, F.; Rascente, M.; Aureli, A. Artificial Organs as a Bridge to Transplantation. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **2003**, *31*, 163–168. <https://doi.org/10.1081/BIO-120020174>.
- (37) Miescher, P. A.; Beris, Ph. Immunosuppressive Therapy in the Treatment of Autoimmune Diseases. *Springer Semin. Immunopathol.* **1984**, *7*, 69–90. <https://doi.org/10.1007/BF01891781>.
- (38) Gharagozloo, M.; Majewski, S.; Foldvari, M. Therapeutic Applications of Nanomedicine in Autoimmune Diseases: From Immunosuppression to Tolerance Induction. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, *11*, 1003–1018. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.12.003>.
- (39) Richard-Eaglin, A.; Smallheer, B. A. Immunosuppressive/Autoimmune Disorders. *Nurs. Clin. North Am.* **2018**, *53*, 319–334. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2018.04.002>.
- (40) Benfaremo, D.; Gabrielli, A. Is There a Future for Anti-CD38 Antibody Therapy in Systemic Autoimmune Diseases? *Cells* **2020**, *9*, 77. <https://doi.org/10.3390/cells9010077>.
- (41) Gao, Y.; Zeng, Y.; Xue, W.; Chen, Y.; Li, Q.; Bian, Z.; Tang, L.; Tang, T.; Chen, C.; Gao, X.; Guo, W. Anti-IL-12/23 P40 Antibody Attenuates Chronic Graft-versus-Host Disease with Lupus Nephritis via Inhibiting Tfh Cell in Mice. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *129*, 110396. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110396>.
- (42) Paolicelli, D.; Drenzo, V.; Trojano, M. Review of Interferon Beta-1b in the Treatment of Early and Relapsing Multiple Sclerosis. *Biol.: Targets Ther.* **2009**, *3*, 369–376.
- (43) Görtz, D.; Braun, G. S.; Maruta, Y.; Djudjaj, S.; van Roeyen, C. R.; Martin, I. V.; Küster, A.; Schmitz-Van de Leur, H.; Scheller, J.; Ostendorf, T.; Floege, J.; Müller-Newen, G. Anti-Interleukin-6 Therapy through Application of a Monogenic Protein Inhibitor via Gene Delivery. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14685. <https://doi.org/10.1038/srep14685>.
- (44) Cemerski, S.; Chu, S. Y.; Moore, G. L.; Muchhal, U. S.; Desjarlais, J. R.; Szymkowski, D. E. Suppression of Mast Cell Degranulation through a Dual-Targeting Tandem IgE-IgG Fc Domain Biologic Engineered to Bind with High Affinity to FcγRIIb. *Immunol. Lett.* **2012**, *143*, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.01.008>.
- (45) Podojil, J. R.; Miller, S. D. Targeting the B7 Family of Co-Stimulatory Molecules. *BioDrugs* **2013**, *27*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s40259-012-0001-6>.
- (46) Wilkins, W. H.; Harris, G. C. M. Investigation into the Production of Bacteriostatic Substances by Fungi. Preliminary Examination of a Second 100 Fungal Species. *Br. J. Exp. Pathol.* **1943**, *24*, 141–143.
- (47) Bentley, R. Mycophenolic Acid: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3801–3826. <https://doi.org/10.1021/cr990097b>.
- (48) Jiang, Z.-D.; An, Z. Bioactive Fungal Natural Products Through Classic and Biocombinatorial Approaches. En *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta-ur-

- Rahman, Ed.; *Bioactive Natural Products (Part C)*; Elsevier: Amsterdam, 2000; Vol. 22, pp 245–272. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(00\)80027-7](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(00)80027-7).
- (49) Orvis, A. K.; Wesson, S. K.; Breza, T. S.; Church, A. A.; Mitchell, C. L.; Watkins, S. W. Mycophenolate Mofetil in Dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2009**, *60*, 183–199. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.08.049>.
- (50) Llinares-Tello, F.; Hernández-Prats, C.; Muñoz-Ruiz, C.; Selva-Otaolaurruchi, J.; Ordovás-Baines, J. P. Monitoring Trough Plasma Concentrations of Mycophenolate Mofetil in Patients with Uveitis. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2004**, *29*, 53–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2710.2003.00536.x>.
- (51) Shen, J.; Jiao, Z.; Yu, Y.-Q.; Zhang, M.; Zhong, M.-K. Quantification of Total and Free Mycophenolic Acid in Human Plasma by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. B* **2005**, *817*, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.12.005>.
- (52) Bohnert, T.; Gan, L.-S. Plasma Protein Binding: From Discovery to Development. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 2953–2994. <https://doi.org/10.1002/jps.23614>.
- (53) Nowak, I.; Shaw, L. M. Mycophenolic Acid Binding to Human Serum Albumin: Characterization and Relation to Pharmacodynamics. *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 1011–1017.
- (54) Dasgupta, A. Monitoring Free Mycophenolic Acid Concentration: Is There Any Clinical Advantage? In *Personalized Immunosuppression in Transplantation*; Oellerich, M., Dasgupta, A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2016; pp 83–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800885-0.00004-7>.
- (55) Bittersohl, H.; Herbinger, J.; Wen, M.; Renders, L.; Steimer, W.; Luppá, P. Simultaneous Determination of Protein-Unbound Cyclosporine A and Mycophenolic Acid in Kidney Transplant Patients Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Ther. Drug Monit.* **2017**, *39*, 211–219. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000392>.
- (56) Kobashigawa, J. A.; Renlund, D. G.; Gerosa, G.; Almenar, L.; Eisen, H. J.; Keogh, A. M.; Lehmkühl, H. B.; Livi, U.; Ross, H.; Segovia, J.; Yonan, N. Similar Efficacy and Safety of Enteric-Coated Mycophenolate Sodium (EC-MPS, Myfortic) Compared With Mycophenolate Mofetil (MMF) in De Novo Heart Transplant Recipients: Results of a 12-Month, Single-Blind, Randomized, Parallel-Group, Multicenter Study. *J. Heart Lung Transplant.* **2006**, *25*, 935–941. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2006.04.005>.
- (57) Picard, N.; Ratanasavanh, D.; Prémaud, A.; Le Meur, Y.; Marquet, P. Identification of the UDP-Glucuronosyltransferase Isoforms Involved in Mycophenolic Acid Phase II Metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 139–146. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001651>.
- (58) Okour, M.; Jacobson, P. A.; Ahmed, M. A.; Israni, A. K.; Brundage, R. C. Mycophenolic Acid (MPA) and Its Metabolites in Kidney Transplant Recipients: A Semi-Mechanistic Enterohepatic Circulation Model to Improve Estimating Exposure. *J. Clin. Pharmacol.* **2018**, *58*, 628–639. <https://doi.org/10.1002/jcph.1064>.
- (59) Bullingham, R. E.; Nicholls, A.; Hale, M. Pharmacokinetics of Mycophenolate Mofetil (RS61443): A Short Review. *Transplant. Proc.* **1996**, *28*, 925–929.
- (60) Kuypers, D. R. J.; Le Meur, Y.; Cantarovich, M.; Tredger, M. J.; Tett, S. E.; Cattaneo, D.; Tönshoff, B.; Holt, D. W.; Chapman, J.; Gelder, T. van; Transplantation Society (TTS) Consensus Group on TDM of MPA. Consensus Report on Therapeutic Drug Monitoring of

- Mycophenolic Acid in Solid Organ Transplantation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *5*, 341-358. <https://doi.org/10.2215/CJN.07111009>.
- (61) Shaw, L. M.; Holt, D. W.; Oellerich, M.; Meiser, B.; van Gelder, T. Current Issues in Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid: Report of a Roundtable Discussion. *Ther. Drug Monit.* **2001**, *23*, 305-315.
- (62) Li, Q.; Cao, D.; Huang, Y.; Xu, H.; Yu, C.; Li, Z. Development and Validation of a Sensitive LC-MS/MS Method for Determination of Tacrolimus on Dried Blood Spots. *Biomed. Chromatogr.* **2013**, *27*, 327-334. <https://doi.org/10.1002/bmc.2795>.
- (63) Shi, Q.; Li, J.; Ding, F. Development and Validation of Method for the Determination of Related Substances of Tacrolimus in Tacrolimus Capsules and Degradation Studies. *Int. J. ChemTech Res.* **2012**, *4*, 1543-1552.
- (64) Lemaitre, F.; Antignac, M.; Fernandez, C. Monitoring of Tacrolimus Concentrations in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Application to Cardiac Transplant Recipients. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 1538-1541. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.02.011>.
- (65) van Gelder, T. Drug Interactions with Tacrolimus. *Drug Safety* **2002**, *25*, 707-712. <https://doi.org/10.2165/00002018-200225100-00003>.
- (66) Corteel, P. Caractéristiques immuno-analytiques du dosage sanguin du tacrolimus. *Immuno-Anal. Biol. Spe.* **2013**, *28*, 144-147. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2012.10.007>.
- (67) Iwasaki, K. Metabolism of Tacrolimus (FK506) and Recent Topics in Clinical Pharmacokinetics. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2007**, *22*, 328-335. <https://doi.org/10.2133/dmpk.22.328>.
- (68) Martins, J. C.; Martins, C.; Aoki, V.; Gois, A. F.; Ishii, H. A.; Silva, E. M. da. Topical Tacrolimus for Atopic Dermatitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, *7*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009864.pub2>.
- (69) Riba Torrecillas, D.; Soler-González, J.; Rodríguez-Rosich, A. Uso de tacrolimus tópico y sus efectos adversos. *Aten. Primaria* **2005**, *36*, 50. <https://doi.org/10.1157/13075932>.
- (70) Said, R.; Pohanka, A.; Abdel-Rehim, M.; Beck, O. Determination of Four Immunosuppressive Drugs in Whole Blood Using MEPS and LC-MS/MS Allowing Automated Sample Work-up and Analysis. *J. Chromatogr. B* **2012**, *897*, 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.04.006>.
- (71) Wallemacq, P.; Armstrong, V. W.; Brunet, M.; Haufroid, V.; Holt, D. W.; Johnston, A.; Kuypers, D.; Meur, Y. L.; Marquet, P.; Oellerich, M.; Thervet, E.; Toenshoff, B.; Undre, N.; Weber, L. T.; Westley, I. S.; Mourad, M. Opportunities to Optimize Tacrolimus Therapy in Solid Organ Transplantation: Report of the European Consensus Conference. *Ther. Drug Monit.* **2009**, *31*, 139-152. <https://doi.org/10.1097/FTD.obo13e318198d092>.
- (72) Tszysrznic, W.; Borowiec, A.; Pawlowska, E.; Jazwiec, R.; Zochowska, D.; Bartlomiejczyk, I.; Zegarska, J.; Paczek, L.; Dadlez, M. Two Rapid Ultra Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (UPLC/MS/MS) Methods with Common Sample Pretreatment for Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressants Compared to Immunoassay. *J. Chromatogr. B* **2013**, *928*, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.014>.
- (73) Garg, U.; Munar, A.; Frazee, C. C. Simultaneous Determination of Cyclosporine, Sirolimus, and Tacrolimus in Whole Blood Using Liquid Chromatography-Tandem Mass

- Spectrometry. En *LC-MS in Drug Analysis: Methods and Protocols*; Langman, L. J., Snozek, C. L. H., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2012; pp 167–173. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-934-1_15.
- (74) Ansermot, N.; Fathi, M.; Veuthey, J.-L.; Desmeules, J.; Rudaz, S.; Hochstrasser, D. Quantification of Cyclosporine and Tacrolimus in Whole Blood. Comparison of Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry with the Enzyme Multiplied Immunoassay Technique. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 910–913. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.02.015>.
- (75) Dittmann, J.; Wenger, R. M.; Kleinkauf, H.; Lawen, A. Mechanism of Cyclosporin A Biosynthesis. Evidence for Synthesis via a Single Linear Undecapeptide Precursor. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2841–2846.
- (76) Rügger, A.; Kuhn, M.; Lichti, H.; Loosli, H.-R.; Huguenin, R.; Quiquerez, C.; Wartburg, A. von. Cyclosporin A, Ein Immunsuppressiv Wirksamer Peptidmetabolit Aus *Trichoderma Polysporum* (LINK Ex PERS.) Rifai. *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1075–1092. <https://doi.org/10.1002/hlca.19760590412>.
- (77) Borel, J. F.; Feurer, C.; Gubler, H. U.; Stähelin, H. Biological Effects of Cyclosporin A: A New Antilymphocytic Agent. *Agents Actions* **1976**, *6*, 468–475. <https://doi.org/10.1007/BF01973261>.
- (78) Copeland, K. R.; Yatscoff, R. W.; McKenna, R. M. Immunosuppressive Activity of Cyclosporine Metabolites Compared and Characterized by Mass Spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance. *Clin. Chem.* **1990**, *36*, 225–229. <https://doi.org/10.1093/clinchem/36.2.225>.
- (79) Atkinson, K.; Britton, K.; Biggs, J. Distribution and Concentration of Cyclosporin in Human Blood. *J. Clin. Pathol.* **1984**, *37*, 1167–1171. <https://doi.org/10.1136/jcp.37.10.1167>.
- (80) Akhlaghi, F.; Trull, A. K. Distribution of Cyclosporin in Organ Transplant Recipients. *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, *41*, 615–637. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241090-00001>.
- (81) Cochrane, A. B.; Lyster, H.; Lindenfeld, J.; Doligalski, C.; Baran, D.; Yost, C.; Shullo, M.; Schweiger, M.; Weill, D.; Stuckey, L.; Ivulich, S.; Scheel, J.; Peters, L.; Colvin, M.; Dawson, K.; Girgis, R.; Weeks, P.; Tse, T.; Russell, S.; Flattery, M.; Jennings, D.; Kittleson, M.; Miller, T.; Khuu, T.; Claridge, T.; Uber, P.; Ford, K.; Ensor, C. R.; Simpson, K.; Dipchand, A.; Page, R. L. Report from the 2018 Consensus Conference on Immunomodulating Agents in Thoracic Transplantation: Access, Formulations, Generics, Therapeutic Drug Monitoring, and Special Populations. *J. Heart Lung Transplant.* **2020**, *39*, 1050–1069. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.06.024>.
- (82) Vézina, C.; Kudelski, A.; Sehgal, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a New Antifungal Antibiotic: I. Taxonomy of the Producing Streptomycete and Isolation of the Active Principle. *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 721–726. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.721>.
- (83) Sehgal, S. N.; Baker, H.; Vézina, C. Rapamycin (AY-22,989), a New Antifungal Antibiotic: II. Fermentation, Isolation and Characterization. *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 727–732. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.727>.
- (84) Sehgal, S. N. Sirolimus: Its Discovery, Biological Properties, and Mechanism of Action. *Transplant. Proc.* **2003**, *35*, S7–S14. [https://doi.org/10.1016/S0041-1345\(03\)00211-2](https://doi.org/10.1016/S0041-1345(03)00211-2).

-
- (85) Sádaba, B.; Campanero, M. A.; Quetglas, E. G.; Azanza, J. R. Clinical Relevance of Sirolimus Drug Interactions in Transplant Patients. *Transplant. Proc.* **2004**, *36*, 3226–3228. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.10.056>.
- (86) Napoli, K. L.; Taylor, P. J. From Beach to Bedside: History of the Development of Sirolimus. *Ther. Drug Monit.* **2001**, *23*, 559–586. <https://doi.org/10.1097/00007691-200110000-00012>.
- (87) Cattaneo, D.; Merlini, S.; Pellegrino, M.; Carrara, F.; Zenoni, S.; Murgia, S.; Baldelli, S.; Gaspari, F.; Remuzzi, G.; Perico, N. Therapeutic Drug Monitoring of Sirolimus: Effect of Concomitant Immunosuppressive Therapy and Optimization of Drug Dosing. *Am. J. Transplant.* **2004**, *4*, 1345–1351. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00517.x>.
- (88) Mahalati, K.; Kahan, B. D. Clinical Pharmacokinetics of Sirolimus. *Clin. Pharmacokinet.* **2001**, *40*, 573–585. <https://doi.org/10.2165/00003088-200140080-00002>.
- (89) Yatscoff, R.; LeGatt, D.; Keenan, R.; Chackowsky, P. Blood Distribution Of Rapamycin. *Transplantation* **1993**, *56*, 1202–1205. <https://doi.org/10.1097/00007890-199311000-00029>.
- (90) Augustine, J. J.; Bodziak, K. A.; Hricik, D. E. Use of Sirolimus in Solid Organ Transplantation. *Drugs* **2007**, *67*, 369–391. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00004>.
- (91) Brody, T. Immunosuppression, Drug-Induced Hypersensitivity Reactions, and Drug-Induced Autoimmune Reactions. En *FDA's Drug Review Process and the Package Label*; Brody, T., Ed.; Academic Press: London, 2018; pp 387–440. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814647-7.00009-9>.
- (92) Watson, I.; Potter, J.; Yatscoff, R.; Fraser, A.; Himberg, J. J.; Wenk, M. Editorial. *Ther. Drug Monit.* **1997**, *19*, 125.
- (93) Dasgupta, A. Issues of Interferences in Therapeutic Drug Monitoring. En *Biotin and Other Interferences in Immunoassays*; Dasgupta, A., Ed.; Elsevier: St. Louis, 2019; pp 99–112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816429-7.00006-X>.
- (94) Dasgupta, A. Introduction to Therapeutic Drug Monitoring: Frequently and Less Frequently Monitored Drugs. In *Therapeutic Drug Monitoring*; Dasgupta, A., Ed.; Academic Press: Boston, 2012; pp 1–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385467-4.00001-4>.
- (95) *Therapeutic Drug Monitoring: Newer Drugs and Biomarkers*; Dasgupta, A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2012.
- (96) Hallworth, M. Therapeutic Drug Monitoring. In *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*; Marshall, W. J., Lapsley, M., Day, A. P., Ayling, R. M., Eds.; Churchill Livingstone: Edinburgh, 2014; pp 767–786. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5140-1.00039-0>.
- (97) Kahan, B. D. Individualization of Cyclosporine Therapy Using Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Parameters. *Transplantation* **1985**, *40*, 457–476.
- (98) Lesko, L. J.; Schmidt, S. Individualization of Drug Therapy: History, Present State, and Opportunities for the Future. *Clin. Pharm. Therap.* **2012**, *92*, 458–466. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.113>.
- (99) *Individualized Drug Therapy for Patients*; Jelliffe, R. W., Neely, M., Eds.; Academic Press: Boston, 2017. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-03786-0>.

- (100) Yano, I. Pharmacodynamic Monitoring of Calcineurin Phosphatase Activity in Transplant Patients Treated with Calcineurin Inhibitors. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2008**, *23*, 150–157. <https://doi.org/10.2133/dmpk.23.150>.
- (101) Sommerer, C.; Zeier, M.; Meuer, S.; Giese, T. Monitoring of Calcineurin Inhibitors by NFAT-regulated Gene Expression in de Novo Renal Allograft Recipients on Cyclosporine A. *Clin. Nephrol.* **2015**, *84*, 165–172. <https://doi.org/10.5414/CN108623>.
- (102) Kannegieter, N. M.; Hesselink, D. A.; Dieterich, M.; Graav, G. N. de; Kraaijeveld, R.; Baan, C. C. Analysis of NFATc1 Amplification in T Cells for Pharmacodynamic Monitoring of Tacrolimus in Kidney Transplant Recipients. *PLOS ONE* **2018**, *13*, e0201113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201113>.
- (103) Li, H.; Mager, D. E.; Sandmaier, B. M.; Storer, B. E.; Boeckh, M. J.; Bemer, M. J.; Phillips, B. R.; Risler, L. J.; McCune, J. S. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis of Inosine Monophosphate Dehydrogenase Activity in Hematopoietic Cell Transplantation Recipients Treated with Mycophenolate Mofetil. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2014**, *20*, 1121–1129. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.03.032>.
- (104) Shao, Z.; Kyriakopoulou, L. G.; Ito, S. Pharmacogenomics. En *Handbook of Analytical Separations*; Hempel, G., Ed.; Methods of Therapeutic Drug Monitoring Including Pharmacogenetics; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 2020; Vol. 7, pp 321–353. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64066-6.00014-9>.
- (105) Dasgupta, A.; Wahed, A. Pharmacogenomics. In *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*; Dasgupta, A., Wahed, A., Eds.; Elsevier: San Diego, 2014; pp 353–362. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407821-5.00020-6>.
- (106) Allegri, L.; Baldan, F.; Vallone, C.; Tulissi, P.; Gropuzzo, M.; Canelles, M. F.; Righi, E.; Adani, G. L.; Baccarani, U.; Montanaro, D.; Risaliti, A.; Damante, G.; Baraldo, M. Tacrolimus Therapeutic Drug Monitoring in Stable Kidney Transplantation and Individuation of CYP3A5 Genotype. *Transplant. Proc.* **2019**, *51*, 2917–2920. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.04.090>.
- (107) Udomkarnjananun, S.; Francke, M. I.; De Winter, B. C. M.; Mulder, M. B.; Baan, C. C.; Metselaar, H. J.; den Hoed, C. M.; Hesselink, D. A. Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs in Hepatology and Gastroenterology. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2021**, *54–55*, 101756. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2021.101756>.
- (108) Seyfinejad, B.; Jouyban, A. Overview of Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs: Analytical and Clinical Practices. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *205*, 114315. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114315>.
- (109) Muller, H.; Solari, S.; Zuniga, C.; Guerra, I.; Troncoso, J.; Ovalle, R.; Morente, J.; Pedreros, C. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid in Kidney Transplant Patients: A Abbreviated Sampling Strategy. *Transplant. Proc.* **2007**, *39*, 596–599. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.12.027>.
- (110) Jorga, A.; Holt, D. W.; Johnston, A. Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine. *Transplant. Proc.* **2004**, *36*, S396–S403. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.01.013>.
- (111) Morris, R. G. Cyclosporin Therapeutic Drug Monitoring - an Established Service Revisited. *Clin. Biochem. Rev.* **2003**, *24*, 33–46.

- (112) Bhalla, N.; Jolly, P.; Formisano, N.; Estrela, P. Introduction to Biosensors. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- (113) *IUPAC Compendium of Chemical Terminology: Gold Book*, 2.1.0.; Nič, M., Jiráč, J., Košata, B., Jenkins, A., McNaught, A., Eds.; IUPAC: Research Triangle Park, NC, 2009. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- (114) González-Rumayor, V.; García-Iglesias, E.; Ruiz-Galán, O.; Gago-Cabezas, L. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria, 2005.
- (115) Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. Chemical Sensors: Definitions and Classification. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 1247–1250. <https://doi.org/10.1351/pac199163091247>.
- (116) Thevenot, D. R.; Tóth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 2333–2348. <https://doi.org/10.1351/pac199971122333>.
- (117) Fan, X.; White, I. M.; Shopova, S. I.; Zhu, H.; Suter, J. D.; Sun, Y. Sensitive Optical Biosensors for Unlabeled Targets: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *620*, 8–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.022>.
- (118) *Handbook of Optical Sensors*; Santos, J. L., Farahi, F., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2014.
- (119) Wang, X.; Wolfbeis, O. S. Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors (2013–2015). *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 203–227. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04298>.
- (120) Banica, F.-G. *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons: Chichester, 2012.
- (121) *Handbook of Chemical and Biological Sensors*; Taylor, R. F., Schultz, J. S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 1996. <https://doi.org/10.1201/9780367802516>.
- (122) Mondal, B.; Ramlal, S.; Lavu, P. S.; N, B.; Kingston, J. Highly Sensitive Colorimetric Biosensor for Staphylococcal Enterotoxin B by a Label-Free Aptamer and Gold Nanoparticles. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00179>.
- (123) Tipler, P. A.; Mosca, G. *Física para la ciencia y la tecnología.*; Reverté: Barcelona, 2005; Vol. 2.
- (124) Benito-Peña, E.; Valdés, M. G.; Glahn-Martínez, B.; Moreno-Bondi, M. C. Fluorescence Based Fiber Optic and Planar Waveguide Biosensors. A Review. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *943*, 17–40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.08.049>.
- (125) Sapsford, K.; Taitt, C. R.; Ligler, F. S. Planar Waveguides for Fluorescence Biosensors. En *Optical Biosensors*; Ligler, F. S., Taitt, C. R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2008; pp 139–184. <https://doi.org/10.1016/B978-044453125-4.50005-X>.
- (126) Axelrod, D.; Burghardt, T. P.; Thompson, N. L. Total Internal Reflection Fluorescence. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1984**, *13*, 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.13.060184.001335>.
- (127) Fahrenfort, J. Attenuated Total Reflection: A New Principle for the Production of Useful Infra-Red Reflection Spectra of Organic Compounds. *Spectrochim. Acta* **1961**, *17*, 698–709. [https://doi.org/10.1016/0371-1951\(61\)80136-7](https://doi.org/10.1016/0371-1951(61)80136-7).
- (128) Homola, J. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*; Springer Ser Chem Sens Biosens; Springer: Berlin, 2006. <https://doi.org/10.1007/b100321>.

- (129) Abolbashari, M.; Farahi, F.; Santos, J. L. Interferometric Measurement: Principles and Techniques. En *Handbook of Optical Sensors*; Santos, J. L., Farahi, F., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2014; pp 111–114.
- (130) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer: New York, 2010.
- (131) Orellana, G. Fluorescence-Based Sensors. En *Optical Chemical Sensors*; Baldini, F., Chester, A. N., Homola, J., Martellucci, S., Eds.; NATO Science Series II: Mathematics, Physics and Chemistry; Springer Netherlands: Dordrecht, 2006; pp 99–116. https://doi.org/10.1007/1-4020-4611-1_6.
- (132) *FRET - Förster Resonance Energy Transfer: From Theory to Applications*; Medintz, I. L., Hildebrandt, N., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2013.
- (133) Peltomaa, R.; Glahn-Martínez, B.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C. Optical Biosensors for Label-Free Detection of Small Molecules. *Sensors* **2018**, *18*, 4126. <https://doi.org/10.3390/s18124126>.
- (134) *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*; Wild, D., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2013.
- (135) Tullila, A.; Nevanen, T. K. Utilization of Multi-Immunization and Multiple Selection Strategies for Isolation of Hapten-Specific Antibodies from Recombinant Antibody Phage Display Libraries. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1169. <https://doi.org/10.3390/ijms18061169>.
- (136) Peltomaa, R.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C. Bioinspired Recognition Elements for Mycotoxin Sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 747–771. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0701-3>.
- (137) Luque-Uría, Á.; Peltomaa, R.; Nevanen, T. K.; Arola, H. O.; Iljin, K.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C. Recombinant Peptide Mimetic NanoLuc Tracer for Sensitive Immunodetection of Mycophenolic Acid. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 10358–10364. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02109>.
- (138) Wilhelm, A. J.; Klijn, A.; den Burger, J. C. G.; Visser, O. J.; Veldkamp, A. I.; Janssen, J. J. W. M.; Swart, E. L. Clinical Validation of Dried Blood Spot Sampling in Therapeutic Drug Monitoring of Ciclosporin A in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Direct Comparison Between Capillary and Venous Sampling. *Ther. Drug Monit.* **2013**, *35*, 92–95. <https://doi.org/10.1097/FTD.obo13e31827d76ce>.
- (139) Hinchliffe, E.; Adaway, J.; Fildes, J.; Rowan, A.; Keevil, B. G. Therapeutic Drug Monitoring of Ciclosporin A and Tacrolimus in Heart Lung Transplant Patients Using Dried Blood Spots: *Ann. Clin. Biochem.* **2013**. <https://doi.org/10.1177/0004563213488759>.
- (140) Sadilkova, K.; Busby, B.; Dickerson, J. A.; Rutledge, J. C.; Jack, R. M. Clinical Validation and Implementation of a Multiplexed Immunosuppressant Assay in Dried Blood Spots by LC-MS/MS. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *421*, 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.02.009>.
- (141) van der Heijden, J.; de Beer, Y.; Hoogtanders, K.; Christiaans, M.; de Jong, G. J.; Neef, C.; Stolk, L. Therapeutic Drug Monitoring of Everolimus Using the Dried Blood Spot Method in Combination with Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50*, 664–670. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.11.021>.
- (142) Wilhelm, A. J.; den Burger, J. C. G.; Vos, R. M.; Chahbouni, A.; Sinjewel, A. Analysis of Cyclosporin A in Dried Blood Spots Using Liquid Chromatography Tandem Mass

- Spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 1595–1598. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.024>.
- (143) Shen, B.; Li, S.; Zhang, Y.; Yuan, X.; Fan, Y.; Liu, Z.; Hu, Q.; Yu, C. Determination of Total, Free and Saliva Mycophenolic Acid with a LC–MS/MS Method: Application to Pharmacokinetic Study in Healthy Volunteers and Renal Transplant Patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50*, 515–521. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.05.030>.
- (144) Ferreira, P. C. L.; Thiesen, F. V.; de Araujo, T. T.; D'Ávila, D. O.; Gadonski, G.; de Oliveira, C. S. A.; Zimmer, A. R.; Fröhlich, P. E. Comparison of Plasma and Oral Fluid Concentrations of Mycophenolic Acid and Its Glucuronide Metabolite by LC-MS in Kidney Transplant Patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2019**, *75*, 553–559. <https://doi.org/10.1007/s00228-018-02614-9>.
- (145) Ghareeb, M.; Akhlaghi, F. Development and Validation of a Sensitive and Selective LC–MS/MS Method for Determination of Tacrolimus in Oral Fluids. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1038*, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.008>.
- (146) Theng, J.; Zhou, L.; Tan, D.; Lam, K.-W. Distribution of Cyclosporin A in the Cornea After Topical or Oral Administration. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2002**, *18*, 83–88. <https://doi.org/10.1089/108076802317233243>.
- (147) Jiao, Z.; Zhong, Y.; Shen, J.; Yu, Y. Simple High-Performance Liquid Chromatographic Assay, with Post-Column Derivatization, for Simultaneous Determination of Mycophenolic Acid and Its Glucuronide Metabolite in Human Plasma and Urine. *Chromatographia* **2005**, *62*, 363–371. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0635-3>.
- (148) Iyer, S. S.; Brophy, G. M.; Karnes, H. T.; Edinboro, L. E.; Bullock, M. R. Quantification of Cyclosporin A in Human Cerebrospinal Fluid by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2007**, *30*, 1733–1747. <https://doi.org/10.1080/10826070701360301>.
- (149) Hiramatsu, Y.; Yoshida, S.; Kotani, T.; Nakamura, E.; Kimura, Y.; Fujita, D.; Nagayasu, Y.; Shabana, K.; Makino, S.; Takeuchi, T.; Arawaka, S. Changes in the Blood Level, Efficacy, and Safety of Tacrolimus in Pregnancy and the Lactation Period in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: *Lupus* **2018**. <https://doi.org/10.1177/0961203318809178>.
- (150) Munoz-Flores-Thiagarajan, K. D.; Easterling, T.; Davis, C.; Bond, E. F. Breast-Feeding by a Cyclosporine-Treated Mother. *Obstet. Gynecol.* **2001**, *97*, 816–818.
- (151) Moretti, M. E.; Sgro, M.; Johnson, D. W.; Sauve, R. S.; Woolgar, M. J.; Taddio, A.; Verjee, Z.; Giesbrecht, E.; Koren, G.; Ito, S. Cyclosporine Excretion into Breast Milk. *Transplantation* **2003**, *75*, 2144–2146. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000066352.86763.Do>.
- (152) Ghareeb, M.; Akhlaghi, F. Alternative Matrices for Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Agents Using LC–MS/MS. *Bioanalysis* **2015**, *7*, 1037–1058. <https://doi.org/10.4155/bio.15.35>.
- (153) Usleber, E.; Dade, M.; Schneider, E.; Dietrich, R.; Bauer, J.; Märtilbauer, E. Enzyme Immunoassay for Mycophenolic Acid in Milk and Cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6857–6862. <https://doi.org/10.1021/jf801063w>.

- (154) Müller, H. M.; Amend, R. Formation and Disappearance of Mycophenolic Acid, Patulin, Penicillic Acid and PR Toxin in Maize Silage Inoculated with *Penicillium Roqueforti*. *Arch. Tierernahr.* **1997**, *50*, 213–225. <https://doi.org/10.1080/17450399709386133>.
- (155) Tangni, E. K.; Pussemier, L.; Bastiaanse, H.; Haesaert, G.; Foucart, G.; Van Hove, F. Presence of Mycophenolic Acid, Roquefortine C, Citrinin and Ochratoxin A in Maize and Grass Silages Supplied to Dairy Cattle in Belgium. *J. Anim. Sci. Adv.* **2013**, *3*, 598.
- (156) Sulyok, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R. A Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Multi-Mycotoxin Method for the Quantification of 87 Analytes and Its Application to Semi-Quantitative Screening of Moldy Food Samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1505–1523. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1542-2>.
- (157) Singleton, C. Recent Advances in Bioanalytical Sample Preparation for LC-MS Analysis. *Bioanalysis* **2012**, *4*, 1123–1140. <https://doi.org/10.4155/BIO.12.73>.
- (158) Karapirli, M.; Kizilgun, M.; Yesilyurt, O.; Gul, H.; Kunak, Z. I.; Akgul, E. O.; Macit, E.; Cayci, T.; Gulcan Kurt, Y.; Aydin, I.; Yaren, H.; Seyrek, M.; Cakir, E.; Yaman, H. Simultaneous Determination of Cyclosporine A, Tacrolimus, Sirolimus, and Everolimus in Whole-Blood Samples by LC-MS/MS. *Sci. World J.* **2012**, *2012*. <https://doi.org/10.1100/2012/571201>.
- (159) Momeneh, H.; Gholivand, M. B. Mycophenolate Mofetil Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer/Multi-Walled Carbon Nanotubes Modified Carbon Paste Electrode. *Anal. Biochem.* **2018**, *557*, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.07.014>.
- (160) Rickert, D. A.; Gómez-Ríos, G. A.; Nazdrajić, E.; Tascon, M.; Kulasingam, V.; Pawliszyn, J. B. Evaluation of a Coated Blade Spray-Tandem Mass Spectrometry Assay as a New Tool for the Determination of Immunosuppressive Drugs in Whole Blood. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412*, 5067–5076. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02367-z>.
- (161) Tascon, M.; Alam, Md. N.; Gómez-Ríos, G. A.; Pawliszyn, J. Development of a Microfluidic Open Interface with Flow Isolated Desorption Volume for the Direct Coupling of SPME Devices to Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 2631–2638. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04295>.
- (162) Baldelli, S.; Zenoni, S.; Merlini, S.; Perico, N.; Cattaneo, D. Simultaneous Determination of Everolimus and Cyclosporine Concentrations by HPLC with Ultraviolet Detection. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *364*, 354–358. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.07.019>.
- (163) Polson, C.; Sarkar, P.; Incledon, B.; Raguvaran, V.; Grant, R. Optimization of Protein Precipitation Based upon Effectiveness of Protein Removal and Ionization Effect in Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2003**, *785*, 263–275. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00914-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00914-5).
- (164) Iyer, H. V.; Przybycien, T. M. Metal Affinity Protein Precipitation: Effects of Mixing, Protein Concentration, and Modifiers on Protein Fractionation. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *48*, 324–332. <https://doi.org/10.1002/bit.260480405>.
- (165) Yang, T.; Cleland, J. L.; Lam, X.; Meyer, J. D.; Jones, L. S.; Randolph, T. W.; Manning, M. C.; Carpenter, J. F. Effect of Zinc Binding and Precipitation on Structures of Recombinant Human Growth Hormone and Nerve Growth Factor. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1480–1485. [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200011\)89:11<1480::AID-JPS10>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200011)89:11<1480::AID-JPS10>3.0.CO;2-M).
- (166) Brusius, M. Navigating the Vast Array of Sample Preparation Techniques for Biological Samples – Whole Blood. *Chromatography Today*. 2016, pp 40–47.

- (167) Glahn-Martínez, B.; Benito-Peña, E.; Salis, F.; Descalzo, A. B.; Orellana, G.; Moreno-Bondi, M. C. Sensitive Rapid Fluorescence Polarization Immunoassay for Free Mycophenolic Acid Determination in Human Serum and Plasma. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 5459–5465. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00780>.
- (168) Zeng, L.; Nath, C. E.; Shaw, P. J.; Earl, J. W.; McLachlan, A. J. HPLC-UV Assay for Monitoring Total and Unbound Mycophenolic Acid Concentrations in Children. *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*, 92–100. <https://doi.org/10.1002/bmc.1088>.
- (169) Dubbelboer, I. R.; Pohanka, A.; Said, R.; Rosenborg, S.; Beck, O. Quantification of Tacrolimus and Three Demethylated Metabolites in Human Whole Blood Using LC-ESI-MS/MS. *Ther. Drug Monit.* **2012**, *34*, 134–142. <https://doi.org/10.1097/FTD.obo13e31824bobfb>.
- (170) Chen, Y.-L.; Hirabayashi, H.; Akhtar, S.; Pelzer, M.; Kobayashi, M. Simultaneous Determination of Three Isomeric Metabolites of Tacrolimus (FK506) in Human Whole Blood and Plasma Using High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2006**, *830*, 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.010>.
- (171) Marinova, M.; Artusi, C.; Brugnolo, L.; Antonelli, G.; Zaninotto, M.; Plebani, M. Immunosuppressant Therapeutic Drug Monitoring by LC-MS/MS: Workflow Optimization through Automated Processing of Whole Blood Samples. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 1723–1727. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.08.013>.
- (172) Upadhyay, V.; Trivedi, V.; Shah, G.; Yadav, M.; Shrivastav, P. S. Rapid and Sensitive UPLC-MS-MS Determination of Tacrolimus in Wistar Rats and Human Blood. *J. Chromatogr. Sci.* **2014**, *52*, 59–67. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms205>.
- (173) Ambrosini, S.; Serra, M.; Shinde, S.; Sellergren, B.; De Lorenzi, E. Synthesis and Chromatographic Evaluation of Molecularly Imprinted Polymers Prepared by the Substructure Approach for the Class-Selective Recognition of Glucuronides. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 6961–6969. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.104>.
- (174) Feng, X.; Cai, J.; Zhao, H.; Chen, X. Rapid Separation and Screening of Mycophenolate Mofetil and Mycophenolic Acid with a Novel (Vinyl Ester) Resin Molecular Imprinted Monolithic Column. *Chromatographia* **2020**, *83*, 749–755. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03893-0>.
- (175) Yin, J.; Wang, S.; Yang, G.; Yang, G.; Chen, Y. Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction for Rapid Screening of Mycophenolic Acid in Human Plasma. *J. Chromatogr. B* **2006**, *844*, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.009>.
- (176) Han, R.; Xing, X.; Wang, Y.; Long, Y.; Sun, Y.; Zhao, Z.; Mi, H. Separation/Enrichment of Active Natural Low Content Protein Using Protein Imprinted Polymer. *J. Chromatogr. B* **2008**, *873*, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.08.003>.
- (177) Senholdt, M.; Siemann, M.; Mosbach, K.; Andersson, L. I. Determination of Cyclosporin A and Metabolites Total Concentration Using a Molecularly Imprinted Polymer Based Radioligand Binding Assay. *Anal. Lett.* **1997**, *30*, 1809–1821. <https://doi.org/10.1080/00032719708001699>.
- (178) Rivera, S. M.; Hwang, J. K.; Slovak, J. E.; Court, M. H.; Villarino, N. F. Simultaneous Determination of Mycophenolic Acid and Its Glucuronide and Glycoside Derivatives in Canine and Feline Plasma by UHPLC-UV. *Biomed. Chromatogr.* **2017**, *31*, e3942. <https://doi.org/10.1002/bmc.3942>.

- (179) Cerqueira, M. B. R.; Guilherme, J. R.; Caldas, S. S.; Martins, M. L.; Zanella, R.; Primel, E. G. Evaluation of the QuEChERS Method for the Extraction of Pharmaceuticals and Personal Care Products from Drinking-Water Treatment Sludge with Determination by UPLC-ESI-MS/MS. *Chemosphere* **2014**, *107*, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.026>.
- (180) Giebułtowicz, J.; Nałęcz-Jawecki, G. Occurrence of Immunosuppressive Drugs and Their Metabolites in the Sewage-Impacted Vistula and Utrata Rivers and in Tap Water from the Warsaw Region (Poland). *Chemosphere* **2016**, *148*, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.135>.
- (181) Vogeser, M.; Kirchhoff, F. Progress in Automation of LC-MS in Laboratory Medicine. *Clin. Biochem.* **2011**, *44*, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.005>.
- (182) Vogeser, M.; Spöhrer, U. Automated Processing of Whole Blood Samples for the Determination of Immunosuppressants by Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2006**, *44*, 1126–1130. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.199>.
- (183) Van den Bossche, D.; Peersman, N.; Desmet, K.; Vermeersch, P.; Pauwels, S. Deproteination of Whole Blood for LC-MS/MS Using Paramagnetic Micro-Particles. *Clin. Biochem.* **2014**, *47*, 112–115. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.06.078>.
- (184) Mora, P.; Ceglarek, U.; Manzotti, F.; Zavota, L.; Carta, A.; Aldigeri, R.; Orsoni, J. G. Cyclosporin A in the Ocular Fluids of Uveitis Patients Following Long-Term Systemic Administration. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2008**, *246*, 1047. <https://doi.org/10.1007/s00417-008-0825-4>.
- (185) Ceglarek, U.; Lembcke, J.; Martin Fiedler, G.; Werner, M.; Witzigmann, H.; Peter Hauss, J.; Thiery, J. Rapid Simultaneous Quantification of Immunosuppressants in Transplant Patients by Turbulent Flow Chromatography Combined with Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *346*, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.03.017>.
- (186) Mueller, D. M.; Rentsch, K. M. Sensitive Quantification of Sirolimus and Everolimus by LC-MS/MS with Online Sample Cleanup. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 1007–1012. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.02.029>.
- (187) Couchman, L. Turbulent Flow Chromatography in Bioanalysis: A Review. *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *26*, 892–905. <https://doi.org/10.1002/bmc.2769>.
- (188) Freudenberger, K.; Hilbig, U.; Gauglitz, G. Recent Advances in Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressive Drugs. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *79*, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.016>.
- (189) Hatsis, P.; Volmer, D. A. Evaluation of a Cyano Stationary Phase for the Determination of Tacrolimus, Sirolimus and Cyclosporin A in Whole Blood by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2004**, *809*, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.06.034>.
- (190) Pedraglio, S.; Rozio, M. G.; Misiano, P.; Reali, V.; Dondio, G.; Bigogno, C. New Perspectives in Bio-Analytical Techniques for Preclinical Characterization of a Drug Candidate: UPLC-MS/MS in in Vitro Metabolism and Pharmacokinetic Studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 665–673. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.12.012>.

- (191) Hinchliffe, E.; Adaway, J. E.; Keevil, B. G. Simultaneous Measurement of Cyclosporin A and Tacrolimus from Dried Blood Spots by Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2012**, *883–884*, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.05.016>.
- (192) Beysens, A. J.; Beuman, G. H.; van der Heijden, J. J.; Hoogtanders, K. E. J.; Steijger, O. M.; Lingeman, H. Determination of Tacrolimus (FK 506) in Whole Blood Using Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *Chromatographia* **1994**, *39*, 490–496. <https://doi.org/10.1007/BF02278767>.
- (193) Bopp, R. J.; Schirmer, R. E.; Meyers, D. B. Determination of Mycophenolic Acid and Its Glucuronide Metabolite in Plasma. *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 1750–1753. <https://doi.org/10.1002/jps.2600611111>.
- (194) Hosotsubo, H.; Takahara, S.; Kokado, Y.; Permpongkosol, S.; Wang, J.-D.; Tanaka, T.; Matsumiya, K.; Kitamura, M.; Okuyama, A.; Sugimoto, H. Rapid and Simple Determination of Mycophenolic Acid in Human Plasma by Ion-Pair RP-LC with Fluorescence Detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *24*, 555–560. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00442-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00442-8).
- (195) Zahr, N.; Amoura, Z.; Debord, J.; Hulot, J.-S.; Saint-Marcoux, F.; Marquet, P.; Piette, J. C.; Lechat, P. Pharmacokinetic Study of Mycophenolate Mofetil in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Design of Bayesian Estimator Using Limited Sampling Strategies. *Clin. Pharmacokinet.* **2008**, *47*, 277–284. <https://doi.org/10.2165/00003088-200847040-00005>.
- (196) Mohamed, R.; Mercolini, L.; Cuennet-Cosandey, S.; Chavent, J.; Raggi, M. A.; Peyrou, M. Validation of a Dried Blood Spot LC–MS/MS Approach for Cyclosporin A in Cat Blood: Comparison with a Classical Sample Preparation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *66*, 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.049>.
- (197) Li, J.-L.; Wang, X.-D.; Wang, C.-X.; Fu, Q.; Liu, L.-S.; Huang, M.; Zhou, S.-F. Rapid and Simultaneous Determination of Tacrolimus (FK506) and Diltiazem in Human Whole Blood by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Application to a Clinical Drug–Drug Interaction Study. *J. Chromatogr. B* **2008**, *867*, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.03.024>.
- (198) Mochizuki, N.; Suka, E.; Matsumoto, K.; Akimoto, O.; Ohno, K.; Shimamura, T.; Furukawa, H.; Todo, S.; Kishino, S. Liquid Chromatographic Method for the Determination of Sirolimus in Blood Using Electrochemical Detection. *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*, 267–272. <https://doi.org/10.1002/bmc.1109>.
- (199) Hermann, M.; Christensen, H.; Reubsæet, J. L. E. Evaluation of Essential Parameters in the Chromatographic Determination of Cyclosporin A and Metabolites Using a D-Optimal Design. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 1263–1276. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00467-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00467-3).
- (200) Khoschsorur, G.; Erwa, W. Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Mycophenolic Acid and Its Phenol- and Acylglucuronide Metabolites in Plasma. *J. Chromatogr. B* **2004**, *799*, 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.074>.
- (201) Koseki, N.; Nakashima, A.; Nagae, Y.; Masuda, N. Simultaneous Quantitative Determination of Cyclosporine A and Its Three Main Metabolites (AM₁, AM_{4N} and AM₉) in Human Blood by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Using a Rapid Sample

- Processing Method. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 733–740. <https://doi.org/10.1002/rcm.2358>.
- (202) Brozmanová, H.; Peřinová, I.; Halvová, P.; Grundmann, M. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Cyclosporine A and Its Three Metabolites AM₁, AM₉ and AM₄N in Whole Blood and Isolated Lymphocytes in Renal Transplant Patients. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 2287–2293. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000185>.
- (203) Klepacki, J.; Klawitter, J.; Bendrick-Peart, J.; Schniedewind, B.; Heischmann, S.; Shokati, T.; Christians, U.; Klawitter, J. A High-Throughput U-HPLC-MS/MS Assay for the Quantification of Mycophenolic Acid and Its Major Metabolites Mycophenolic Acid Glucuronide and Mycophenolic Acid Acyl-Glucuronide in Human Plasma and Urine. *J. Chromatogr. B* **2012**, *883–884*, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.021>.
- (204) Vogeser, M.; Zachoval, R.; Spöhrer, U.; Jacob, K. Potential Lack of Specificity Using Electrospray Tandem-Mass Spectrometry for the Analysis of Mycophenolic Acid in Serum. *Ther. Drug Monit.* **2001**, *23*, 722–724. <https://doi.org/10.1097/00007691-200112000-00021>.
- (205) Wilson, D. H.; Sepe, D.; Barnes, G.; Johnston, F. Inter-Laboratory Differences in Sirolimus Results from Six Sirolimus Testing Centers Using HPLC Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). *Clin. Chim. Acta* **2005**, *355*, 211–213. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.01.005>.
- (206) Napoli, K. L.; Hammett-Stabler, C.; Taylor, P. J.; Lowe, W.; Franklin, M. E.; Morris, M. R.; Cooper, D. P. Multi-Center Evaluation of a Commercial Kit for Tacrolimus Determination by LC/MS/MS. *Clin. Biochem.* **2010**, *43*, 910–920. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.03.016>.
- (207) Khokhlov, A. L.; Yaichkov, I. I.; Dzhurko, Y. A.; Shitov, L. N.; Shitova, A. A. Methodical Approaches to Bioassay of Substances Containing Unstable Functional Groups. *Res. Results Pharmacol.* **2018**, *4*, 33–42. <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.4.25253>.
- (208) Kienana, M.; Lydie, N.-D.; Jean-Michel, H.; Binta, D.; Matthias, B.; Patrick, E.; Hélène, B.; Chantal, L. G. Elucidating Time-Dependent Changes in the Urinary Metabolome of Renal Transplant Patients by a Combined ¹H NMR and GC-MS Approach. *Mol. BioSyst.* **2015**, *11*, 2493–2510. <https://doi.org/10.1039/C5MB00108K>.
- (209) Diémé, B.; Halimi, J. M.; Emond, P.; Büchler, M.; Nadal-Desbarat, L.; Blasco, H.; Le Guellec, C. Assessing the Metabolic Effects of Calcineurin Inhibitors in Renal Transplant Recipients by Urine Metabolic Profiling. *Transplantation* **2014**, *98*, 195–201. <https://doi.org/10.1097/TP.000000000000039>.
- (210) Vinale, F.; Salvatore, M. M.; Nicoletti, R.; Staropoli, A.; Manganiello, G.; Venneri, T.; Borrelli, F.; DellaGreca, M.; Salvatore, F.; Andolfi, A. Identification of the Main Metabolites of a Marine-Derived Strain of *Penicillium Brevicompectum* Using LC and GC MS Techniques. *Metabolites* **2020**, *10*, 55. <https://doi.org/10.3390/metabo10020055>.
- (211) Böer, T. M.; Procópio, J. V. V.; Nascimento, T. G. do; Macêdo, R. O. Correlation of Thermal Analysis and Pyrolysis Coupled to GC-MS in the Characterization of Tacrolimus. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *73*, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.040>.
- (212) Jegorov, A.; Cvak, L.; Husek, A.; Šimek, P.; Heydová, A.; Ondráček, J.; Pakhomova, S.; Hušák, M.; Kratochvíl, B.; Sedmera, P.; Havlíček, V. Synthesis and Crystal Structure

- Determination of Cyclosporin H. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, *65*, 1317–1328. <https://doi.org/10.1135/cccc20001317>.
- (213) Paniagua-González, L.; Díaz-Louzao, C.; Lendoiro, E.; Otero-Antón, E.; Cadarso-Suárez, C.; López-Rivadulla, M.; Cruz, A.; de-Castro-Ríos, A. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) for Assaying Immunosuppressants from Venous Whole Blood by LC-MS/MS Using a Novel Atmospheric Pressure Ionization Probe (UniSpray™). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *189*, 113422. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113422>.
- (214) Jung, H. J.; Gwon, M.-R.; Park, J.; Seo, J. J.; Seong, S. J.; Kim, E. H.; Suh, S. R.; Jeong, J. Y.; Lee, H. W.; Yoon, Y.-R. Quantitative Determination of Cyclosporine in Human Whole Blood by Ultra-Performance Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Sci.* **2014**, *30*, 293–298. <https://doi.org/10.2116/analsci.30.293>.
- (215) Vosough, M.; Tehrani, S. M. Development of a Fast HPLC-DAD Method for Simultaneous Quantitation of Three Immunosuppressant Drugs in Whole Blood Samples Using Intelligent Chemometrics Resolving of Coeluting Peaks in the Presence of Blood Interferences. *J. Chromatogr. B* **2018**, *1073*, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.012>.
- (216) Atcheson, B.; Taylor, P. J.; Mudge, D. W.; Johnson, D. W.; Pillans, P. I.; Tett, S. E. Quantification of Free Mycophenolic Acid and Its Glucuronide Metabolite in Human Plasma by Liquid-Chromatography Using Mass Spectrometric and Ultraviolet Absorbance Detection. *J. Chromatogr. B* **2004**, *799*, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.033>.
- (217) NANOphtonic DEvice for Multiple therapeutic drug monitoring. Proyectos FP7-ICT. European Commission | CORDIS <https://cordis.europa.eu/project/id/318372>.
- (218) Schroeder, H. W.; Cavacini, L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>.
- (219) Encyclopædia Britannica. Antibody structure and classes <https://www.britannica.com/science/antibody>.
- (220) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*; Garland Science: New York, 2015.
- (221) Kindt, T. J.; Goldsby, R. A.; Osborne, B. A. *Inmunología de Kuby*, 6th ed.; McGraw Hill: México, 2007.
- (222) Tengerdy, R. P. Reaction Kinetic Studies of the Antigen Antibody Reaction. *J. Immunol. Res.* **1967**, *99*, 126–132.
- (223) Hellsing, K. Immune Reactions in Polysaccharide Media. Investigation on Complex-Formation between Some Polysaccharides, Albumin and Immunoglobulin G. *Biochem. J.* **1969**, *112*, 483–487.
- (224) Köhler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>.
- (225) Goodsell, D. PDB101: Molecule of the Month: Major Histocompatibility Complex. *RCSB: PDB-101* **2005**. https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2005_2.
- (226) Herranz de Andrés, S. *Tesis Doctoral*. “Nuevas Herramientas Analíticas Para La Determinación de Contaminantes En El Medio Ambiente y En Alimentos”; Universidad Complutense de Madrid, 2013.

- (227) Huet, E.; Morand, K.; Blanchet, B.; Astier, A.; Hulin, A. Evaluation of the New Heterogeneous ACMIA Immunoassay for the Determination of Whole-Blood Cyclosporine Concentrations in Bone Marrow, Kidney, Heart, and Liver Transplant Recipients. *Transplant. Proc.* **2004**, *36*, 1317-1320. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.05.062>.
- (228) Henderson, D. R.; Friedman, S. B.; Harris, J. D.; Manning, W. B.; Zoccoli, M. A. CEDIA, a New Homogeneous Immunoassay System. *Clin. Chem.* **1986**, *32*, 1637-1641. <https://doi.org/10.1093/clinchem/32.9.1637>.
- (229) Vogeser, M.; Shipkova, M.; Rigo-Bonnin, R.; Wallemacq, P.; Orth, M.; Widmann, M.; Verstraete, A. G. Multicenter Analytical Evaluation of the Automated Electrochemiluminescence Immunoassay for Cyclosporine. *Ther. Drug Monit.* **2014**, *36*, 640-650. <https://doi.org/10.1097/FTD.000000000000068>.
- (230) Drost, R. H.; Plomp, Th. A.; Teunissen, A. J.; Maas, A. H. J.; Maes, R. A. A. A Comparative Study of the Homogeneous Enzyme Immunoassay (EMIT) and Two Radioimmunoassays (RIA'S) for Digoxin. *Clin. Chim. Acta* **1977**, *79*, 557-567. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(77\)90176-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(77)90176-0).
- (231) Grenier, F. C.; Luczkiw, J. A.; Bergmann, M. E.; Blonski, D. R. Stable Aqueous FK506 Standards. US5338684A, August 16, 1994.
- (232) Catálogo QMS de Thermo Scientific Technology para la determinación de FK506 <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CDD/Package-Inserts/10015557-QMS-Tacrolimus-Assay-EN.pdf>.
- (233) Mika, A.; Stepnowski, P. Current Methods of the Analysis of Immunosuppressive Agents in Clinical Materials: A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *127*, 207-231. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.059>.
- (234) Prémaud, A.; Rousseau, A.; Picard, N.; Marquet, P. Determination of Mycophenolic Acid Plasma Levels in Renal Transplant Recipients Co-Administered Sirolimus: Comparison of an Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT) and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Ther. Drug Monit.* **2006**, *28*, 274-277. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000197092.84935.ef>.
- (235) Kaneko, T.; Fujioka, T.; Suzuki, Y.; Nagano, T.; Sato, Y.; Asakura, S.; Itoh, H. Comparison of Whole-Blood Tacrolimus Concentrations Measured by Different Immunoassay Systems. *J. Clin. Lab. Anal.* **2018**, *32*, e22587. <https://doi.org/10.1002/jcla.22587>.
- (236) Bargnoux, A.-S.; Sutra, T.; Badiou, S.; Kuster, N.; Dupuy, A.-M.; Mourad, G.; Pageaux, G.-P.; Quintrec, M. L.; Cristol, J.-P. Evaluation of the New Siemens Tacrolimus Assay on the Dimension EXL Integrated Chemistry System Analyzer: Comparison With an Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method. *Ther. Drug Monit.* **2016**, *38*, 808-812. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000331>.
- (237) Polledri, E.; Mercadante, R.; Fusarini, C. F.; Maiavacca, R.; Fustinoni, S. Immunosuppressive Drugs in Whole Blood: Validation of a Commercially Available Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Kit and Comparison with Immunochemical Assays. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2017**, *31*, 1111-1120. <https://doi.org/10.1002/rcm.7887>.
- (238) Shipkova, M.; Vogeser, M.; Ramos, P. A.; Verstraete, A. G.; Orth, M.; Schneider, C.; Wallemacq, P. Multi-Center Analytical Evaluation of a Novel Automated Tacrolimus

- Immunoassay. *Clin. Biochem.* **2014**, *47*, 1069–1077. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.03.023>.
- (239) Aresta, A.; Palmisano, F.; Zambonin, C. G.; Schena, P.; Grandaliano, G. Simultaneous Determination of Free Mycophenolic Acid and Its Glucuronide in Serum of Patients under Mycophenolate Mophetil Therapy by Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography with Diode Array UV Detection. *J. Chromatogr. B* **2004**, *810*, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.07.032>.
- (240) Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com.
- (241) Dasgupta, A.; Tso, G.; Chow, L. Comparison of Mycophenolic Acid Concentrations Determined by a New PETINIA Assay on the Dimension EXL Analyzer and a HPLC-UV Method. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 685–687. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.11.025>.
- (242) Butch, A. W.; Fukuchi, A. M. Analytical Performance of the CEDIA® Cyclosporine PLUS Whole Blood Immunoassay. *J. Anal. Toxicol.* **2004**, *28*, 204–210. <https://doi.org/10.1093/jat/28.3.204>.
- (243) Terrell, A. R.; Daly, T. M.; Hock, K. G.; Kilgore, D. C.; Wei, T. Q.; Hernandez, S.; Weibe, D.; Fields, L.; Shaw, L. M.; Scott, M. G. Evaluation of a No-Pretreatment Cyclosporin A Assay on the Dade Behring Dimension RxL Clinical Chemistry Analyzer. *Clin. Chem.* **2002**, *48*, 1059–1065. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.7.1059>.
- (244) Hamwi, A.; Veitl, M.; Männer, G.; Ruzicka, K.; Schweiger, C.; Szekeres, T. Evaluation of Four Automated Methods for Determination of Whole Blood Cyclosporine Concentrations. *Am. J. Clin. Pathol.* **1999**, *112*, 358–365. <https://doi.org/10.1093/ajcp/112.3.358>.
- (245) Steimer, W. Performance and Specificity of Monoclonal Immunoassays for Cyclosporine Monitoring: How Specific Is Specific? *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 371–381. <https://doi.org/10.1093/clinchem/45.3.371>.
- (246) Schütz, E.; Svinarov, D.; Shipkova, M.; Niedmann, P.-D.; Armstrong, V. W.; Wieland, E.; Oellerich, M. Cyclosporin Whole Blood Immunoassays (AxSYM, CEDIA, and Emit): A Critical Overview of Performance Characteristics and Comparison with HPLC. *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 2158–2164. <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.10.2158>.
- (247) Westley, I. S.; Taylor, P. J.; Salm, P.; Morris, R. G. Cloned Enzyme Donor Immunoassay Tacrolimus Assay Compared With High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Microparticle Enzyme Immunoassay in Liver and Renal Transplant Recipients. *Ther. Drug Monit.* **2007**, *29*, 584–591. <https://doi.org/10.1097/FTD.ob013e31811f25df>.
- (248) Butch, A. W. Immunosuppressive Drugs. In *Handbook of Drug Monitoring Methods: Therapeutics and Drugs of Abuse*; Dasgupta, A., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2008; pp 165–199. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-031-7_9.
- (249) Dasgupta, A.; Wahed, A. Interferences in Therapeutic Drug Monitoring. In *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*; Dasgupta, A., Wahed, A., Eds.; Elsevier: San Diego, 2014; pp 275–287. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407821-5.00015-2>.

- (250) Levine, D. M.; Maine, G. T.; Armbruster, D. A.; Mussell, C.; Buchholz, C.; O'Connor, G.; Tuck, V.; Johnston, A.; Holt, D. W. The Need for Standardization of Tacrolimus Assays. *Clin. Chem.* **2011**, *57*, 1739–1747. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.172080>.
- (251) Shipkova, M.; Schütz, E.; Besenthal, I.; Fraunberger, P.; Wieland, E. Investigation of the Crossreactivity of Mycophenolic Acid Glucuronide Metabolites and of Mycophenolate Mofetil in the Cedia MPA Assay. *Ther. Drug Monit.* **2010**, *32*, 79–85. <https://doi.org/10.1097/FTD.obo13e3181cc342a>.
- (252) Rebollo, N.; Calvo, M. V.; Martín-Suárez, A.; Domínguez-Gil, A. Modification of the EMIT Immunoassay for the Measurement of Unbound Mycophenolic Acid in Plasma. *Clin. Biochem.* **2011**, *44*, 260–263. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.09.025>.
- (253) Menotta, M.; Biagiotti, S.; Streppa, L.; Rossi, L.; Magnani, M. Label-Free Quantification of Tacrolimus in Biological Samples by Atomic Force Microscopy. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *884*, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.014>.
- (254) Chang, K.; Wang, F.; Ding, Y.; Pan, F.; Li, F.; Jia, S.; Lu, W.; Deng, S.; Shi, J.; Chen, M. Development and Validation of a Novel Leaky Surface Acoustic Wave Immunosensor Array for Label-Free and High-Sensitive Detection of Cyclosporin A in Whole-Blood Samples. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.066>.
- (255) Salis, F.; Descalzo, A. B.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. Highly Fluorescent Magnetic Nanobeads with a Remarkable Stokes Shift as Labels for Enhanced Detection in Immunoassays. *Small* **2018**, *14*, 1703810. <https://doi.org/10.1002/sml.201703810>.
- (256) Murakami, Y.; Endo, T.; Yamamura, S.; Nagatani, N.; Takamura, Y.; Tamiya, E. On-Chip Micro-Flow Polystyrene Bead-Based Immunoassay for Quantitative Detection of Tacrolimus (FK506). *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.07.029>.
- (257) Cherry, M.; Dutzer, D.; Nasser, Y.; Berger, A.-E.; Roblin, X.; Paul, S. Point-of-Care Assays Could Be Useful for Therapeutic Drug Monitoring of IBD Patients in a Proactive Strategy with Adalimumab. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2739. <https://doi.org/10.3390/jcm9092739>.
- (258) Nasser, Y.; Labetoulle, R.; Harzallah, I.; Berger, A.-E.; Roblin, X.; Paul, S. Comparison of Point-of-Care and Classical Immunoassays for the Monitoring of Influximab and Antibodies Against Influximab in IBD. *Dig. Dis. Sci.* **2018**, *63*, 2714–2721. <https://doi.org/10.1007/s10620-018-5144-y>.
- (259) Afonso, J.; Lopes, S.; Gonçalves, R.; Caldeira, P.; Lago, P.; Tavares de Sousa, H.; Ramos, J.; Gonçalves, A. R.; Ministro, P.; Rosa, I.; Vieira, A. I.; Dias, C. C.; Magro, F.; Group (GEDII), P. I. S. Proactive Therapeutic Drug Monitoring of Influximab: A Comparative Study of a New Point-of-Care Quantitative Test with Two Established ELISA Assays. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2016**, *44*, 684–692. <https://doi.org/10.1111/apt.13757>.
- (260) Weber, S.; Tombelli, S.; Giannetti, A.; Trono, C.; O'Connell, M.; Wen, M.; Descalzo, A. B.; Bittersohl, H.; Bietenbeck, A.; Marquet, P.; Renders, L.; Orellana, G.; Baldini, F.; Lippa, P. B. Immunosuppressant Quantification in Intravenous Microdialysate – towards Novel Quasi-Continuous Therapeutic Drug Monitoring in Transplanted Patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2021**, *59*, 935–945. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1542>.
- (261) Berrettoni, C.; Berneschi, S.; Bernini, R.; Giannetti, A.; Grimaldi, I. A.; Persichetti, G.; Testa, G.; Tombelli, S.; Trono, C.; Baldini, F. Optical Monitoring of Therapeutic Drugs

- with a Novel Fluorescence- Based POCT Device. *Procedia Eng.* **2014**, *87*, 392–395. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2014.11.732>.
- (262) Liu, Y.-C.; Thantrakul, C.; Kan, S.; Chang-Hasnain, C.; Ho, D.-R. Feasibility of Using High-Contrast Grating as a Point-of-Care Sensor for Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressants. *IEEE J. Transl. Eng. Health Med.* **2020**, *8*, 1–6. <https://doi.org/10.1109/JTEHM.2020.2966478>.
- (263) Wu, F.-B.; Yang, Y.-Y.; Wang, X.-B.; Wang, Z.; Zhang, W.-W.; Liu, Z.-Y.; Qian, Y.-Q. A Sample Processing Method for Immunoassay of Whole Blood Tacrolimus. *Anal. Biochem.* **2019**, *576*, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.04.006>.
- (264) Andreeva, I. P.; Vorobyeva, N. T.; Vinnitsky, L. I.; Bogush, S. S.; Gavrilova, E. M.; Egorov, A. M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Determination of Cyclosporin a in the Whole Blood. *Biochem. (Mosc.) Suppl. B: Biomed. Chem.* **2011**, *5*, 72–75. <https://doi.org/10.1134/S1990750811010021>.
- (265) Mori, K.; Kimura, S.; Matsui, M.; Suehisa, E.; Hidaka, Y.; Fukushima, N. Latex-Enhanced Turbidimetric Immunoassay for Everolimus in Whole Blood Using the Nanopia TDM Everolimus Assay With the JCA-BM6010 Automatic Analyzer. *Ther. Drug Monit.* **2014**, *36*, 677–680. <https://doi.org/10.1097/FTD.000000000000057>.
- (266) Vergara Chozas, J. M.; Sáez-Benito Godino, A.; Zopeque García, N.; García Pinteño, S.; Joumady, I.; Carrasco García, C.; Vara Gil, F. Analytical Validation of a Homogeneous Immunoassay for Determination of Mycophenolic Acid in Human Plasma. *Transplant. Proc.* **2012**, *44*, 2669–2672. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.09.063>.
- (267) Zhang, Z.; Zhang, Y.; Yu, H.; Rong, S.; Gao, H.; Meng, L.; Dai, J.; Pan, H.; Chang, D. Spherical Carrier Amplification Strategy for Electrochemical Immunosensor Based on Polystyrene-Gold Nanorods @L-Cysteine/MoS₂ for Determination of Tacrolimus. *Talanta* **2020**, *220*, 121321. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121321>.
- (268) Dasgupta, A.; Davis, B.; Chow, L. Evaluation of QMS Everolimus Assay Using Hitachi 917 Analyzer: Comparison with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Ther. Drug Monit.* **2011**, *33*, 149–154. <https://doi.org/10.1097/FTD.ob013e31820afc97>.
- (269) Tempestilli, M.; Di Stasio, E.; Basile, M. R.; Elisei, F.; Antonini, M.; Ettore, G. M.; Iappelli, M.; Pucillo, L. P. Low Plasma Concentrations of Albumin Influence the Affinity Column-Mediated Immunoassay Method for the Measurement of Tacrolimus in Blood During the Early Period After Liver Transplantation. *Ther. Drug Monit.* **2013**, *35*, 96–100. <https://doi.org/10.1097/FTD.ob013e318279dfd2>.
- (270) Shi, R.-Z.; El Gierari, E. T. M.; Manicke, N. E.; Faix, J. D. Rapid Measurement of Tacrolimus in Whole Blood by Paper Spray-Tandem Mass Spectrometry (PS-MS/MS). *Clin. Chim. Acta* **2015**, *441*, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.12.022>.
- (271) Jourdil, J.-F.; Picard, P.; Meunier, C.; Auger, S.; Stanke-Labesque, F. Ultra-Fast Cyclosporin A Quantitation in Whole Blood by Laser Diode Thermal Desorption – Tandem Mass Spectrometry; Comparison with High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *805*, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.10.051>.
- (272) Grote-Koska, D.; Czajkowski, S.; Brand, K. Performance of the New RapidFire System for Therapeutic Monitoring of Immunosuppressants. *Ther. Drug Monit.* **2015**, *37*, 400–404. <https://doi.org/10.1097/FTD.000000000000139>.

- (273) Marzejon, M.; Kosowska, M.; Majchrowicz, D.; Bułło-Piontecka, B.; Wąsowicz, M.; Jędrzejewska-Szczerska, M. Optical-Spectrometry-Based Method for Immunosuppressant Medicine Level Detection in Aqueous Solutions. *Sensors* **2018**, *18*, 2001. <https://doi.org/10.3390/s18072001>.
- (274) Marzejon, M.; Kosowska, M.; Majchrowicz, D.; Bułło-Piontecka, B.; Wąsowicz, M.; Jędrzejewska-Szczerska, M. Label-Free Optical Detection of Cyclosporine in Biological Fluids. *J. Biophotonics* **2019**, *12*, e201800273. <https://doi.org/10.1002/jbio.201800273>.
- (275) Li, S.; Yang, M.; Zhou, W.; Johnston, T. G.; Wang, R.; Zhu, J. Dextran Hydrogel Coated Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRi) Sensor for Sensitive and Label-Free Detection of Small Molecule Drugs. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *355*, 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.05.020>.
- (276) Zhou, W.; Yang, M.; Li, S.; Zhu, J. Surface Plasmon Resonance Imaging Validation of Small Molecule Drugs Binding on Target Protein Microarrays. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *450*, 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.04.072>.
- (277) Griss, R.; Schena, A.; Reymond, L.; Patiny, L.; Werner, D.; Tinberg, C. E.; Baker, D.; Johnsson, K. Bioluminescent Sensor Proteins for Point-of-Care Therapeutic Drug Monitoring. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 598–603. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1554>.
- (278) Mansouri, A.; Abnous, K.; Nabavinia, M. S.; Ramezani, M.; Taghdisi, S. M. In Vitro Selection of Tacrolimus Binding Aptamer by Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment Method for the Development of a Fluorescent Aptasensor for Sensitive Detection of Tacrolimus. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *177*, 112853. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112853>.
- (279) Peri-Okonny, U. L. Characterization of Degradation Profile for Sirolimus by CE/MS; 38th Middle Atlantic Regional Meeting of the American Chemical Society, 2006; p MRM-422.
- (280) Hsieh, Y.-L.; Cai, J.; Li, Y.-T.; Henion, J. D.; Ganem, B. Detection of Noncovalent FKBP-FK506 and FKBP-Rapamycin Complexes by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6*, 85–90. <https://doi.org/10.1021/jasms.8b00678>.
- (281) Carlucci, F.; Anzini, M.; Rovini, M.; Cattaneo, D.; Merlini, S.; Tabucchi, A. Development of a CE Method for the Determination of Mycophenolic Acid in Human Plasma: A Comparison with HPLC. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 3908–3914. <https://doi.org/10.1002/elps.200700190>.
- (282) Shihabi, Z. K. Enhanced Detection in Capillary Electrophoresis: Example Determination of Serum Mycophenolic Acid. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 1516–1521. <https://doi.org/10.1002/elps.200800587>.
- (283) Ohyama, K.; Kishikawa, N.; Nakagawa, H.; Kuroda, N.; Nishikido, M.; Teshima, M.; To, H.; Kitahara, T.; Sasaki, H. Simultaneous Determination of Mycophenolic Acid and Its Acyl and Phenol Glucuronide Metabolites in Human Serum by Capillary Zone Electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.028>.
- (284) Gómez-Ríos, G. A.; Tascon, M.; Reyes-Garcés, N.; Boyacı, E.; Poole, J. J.; Pawliszyn, J. Rapid Determination of Immunosuppressive Drug Concentrations in Whole Blood by Coated Blade Spray-Tandem Mass Spectrometry (CBS-MS/MS). *Anal. Chim. Acta* **2018**, *999*, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.016>.

- (285) Dasgupta, A. *Therapeutic Drug Monitoring: Newer Drugs and Biomarkers*; Academic Press: London, 2012.
- (286) Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2012. <https://doi.org/10.1002/9783527650002.ch7>.
- (287) Nielsen, K.; Lin, M.; Gall, D.; Jolley, M. Fluorescence Polarization Immunoassay: Detection of Antibody to Brucella Abortus. *Methods* **2000**, *22*, 71–76. <https://doi.org/10.1006/meth.2000.1038>.
- (288) Roberts, M.; Arabshahi, L.; Boyd, J.; Dennis, C. T.; Marbach, P.; Aaron, G.; Hwang, D.; Shvets, A. B. Immunoassays for Everolimus. US7223553B2, May 29, 2007.
- (289) Sanghvi, A.; Diven, W.; Seltman, H.; Starzl, T. Abbott's Fluorescence Polarization Immunoassay for Cyclosporine and Metabolites Compared with the Sandoz "Sandimmune" RIA. *Clin. Chem.* **1988**, *34*, 1904–1906.
- (290) Jameson, D. M.; Ross, J. A. Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging. *Chem Rev* **2010**, *110*, 2685–2708. <https://doi.org/10.1021/cr900267p>.
- (291) Yuan, L.; Lin, W.; Zheng, K.; He, L.; Huang, W. Far-Red to near Infrared Analyte-Responsive Fluorescent Probes Based on Organic Fluorophore Platforms for Fluorescence Imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *42*, 622–661. <https://doi.org/10.1039/C2CS35313J>.
- (292) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620–2640. <https://doi.org/10.1021/cr900263j>.
- (293) Turek-Etienne, T. C.; Lei, M.; Terracciano, J. S.; Langsdorf, E. F.; Bryant, R. W.; Hart, R. F.; Horan, A. C. Use of Red-Shifted Dyes in a Fluorescence Polarization AKT Kinase Assay for Detection of Biological Activity in Natural Product Extracts: *J. Biomol. Screen.* **2016**. <https://doi.org/10.1177/1087057103259346>.
- (294) Gómez-Hens, A.; Aguilar-Caballos, M. P. Long-Wavelength Fluorophores: New Trends in Their Analytical Use. *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00305-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00305-X).
- (295) Sens, R.; Drexhage, K. H. Fluorescence Quantum Yield of Oxazine and Carbazine Laser Dyes. *J. Lumin.* **1981**, *24–25*, 709–712. [https://doi.org/10.1016/0022-2313\(81\)90075-2](https://doi.org/10.1016/0022-2313(81)90075-2).
- (296) Sánchez-Martínez, M. L.; Aguilar-Caballos, M. P.; Gómez-Hens, A. Long-Wavelength Fluorescence Polarization Immunoassay: Determination of Amikacin on Solid Surface and Gliadins in Solution. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7424–7430. <https://doi.org/10.1021/aco70761l>.
- (297) Desfosses, B.; Urios, P.; Christeff, N.; Rajkowski, K. M.; Cittanova, N. The Use of Disulfonatonaphthalimide Fluorescent Dyes for the Fluorescence Polarization Immunoassay of Steroids. *Anal. Biochem.* **1986**, *159*, 179–186. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90325-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90325-8).
- (298) Hanani, M. Lucifer Yellow – an Angel Rather than the Devil. *J. Cell. Mol. Med.* **2012**, *16*, 22–31. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01378.x>.
- (299) Fürstenberg, A.; Vauthey, E. Excited-State Dynamics of the Fluorescent Probe Lucifer Yellow in Liquid Solutions and in Heterogeneous Media. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 260–267. <https://doi.org/10.1039/B418188C>.

- (300) Palmer, D. A.; Xuezhen, R.; Fernandez-Hernando, P.; Miller, J. N. A Model On-Line Flow Injection Fluorescence Immunoassay Using a Protein a Immunoreactor and Lucifer Yellow. *Anal. Lett.* **1993**, *26*, 2543–2553. <https://doi.org/10.1080/00032719308017972>.
- (301) Urios, P.; Cittanova, N. Adaptation of Fluorescence Polarization Immunoassay to the Assay of Macromolecules. *Anal. Biochem.* **1990**, *185*, 308–312. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90299-O](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90299-O).
- (302) Abbaci, M.; Barberi-Heyob, M.; Blondel, W.; Guillemin, F.; Didelon, J. Advantages and Limitations of Commonly Used Methods to Assay the Molecular Permeability of Gap Junctional Intercellular Communication. *Biotechniques* **2008**, *45*, 33–62. <https://doi.org/10.2144/000112810>.
- (303) Sørensen, T. J.; Thyraug, E.; Szabelski, M.; Luchowski, R.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Laursen, B. W. Azadioxatriangulenium: A Long Fluorescence Lifetime Fluorophore for Large Biomolecule Binding Assay. *Methods Appl. Fluoresc.* **2013**, *1*, 025001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/1/2/025001>.
- (304) Laursen, B. W.; Bogh, S. A.; Sørensen, T. J. Long Fluorescence Lifetime Triangulenium Dyes in Imaging and Fluorescence Polarization Assay. In *Methods in Enzymology*; Chenoweth, D. M., Ed.; Chemical Tools for Imaging, Manipulating, and Tracking Biological Systems: Diverse Methods Based on Optical Imaging and Fluorescence; Academic Press: Cambridge, 2020; Vol. 640, pp 249–265. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.04.031>.
- (305) Barsuk, I.; Lainé, P. P.; Maurel, F.; Brémond, É. Triangulenium Dyes: The Comprehensive Photo-Absorption and Emission Story of a Versatile Family of Chromophores. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 20673–20684. <https://doi.org/10.1039/DoCP02990D>.
- (306) Martin, J. C.; Smith, R. G. Factors Influencing the Basicities of Triarylcarbinols. The Synthesis of Sesquixanthidrol. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2252–2256. <https://doi.org/10.1021/jao1065a030>.
- (307) Thyraug, E.; Sørensen, T. J.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Laursen, B. W. Polarization and Symmetry of Electronic Transitions in Long Fluorescence Lifetime Triangulenium Dyes. *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 2160–2168. <https://doi.org/10.1021/jp312376k>.
- (308) Hall, M. D.; Yasgar, A.; Peryea, T.; Braisted, J. C.; Jadhav, A.; Simeonov, A.; Coussens, N. P. Fluorescence Polarization Assays in High-Throughput Screening and Drug Discovery: A Review. *Methods Appl. Fluoresc.* **2016**, *4*, 022001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/2/022001>.
- (309) Guo, X.-Q.; Castellano, F. N.; Li, L.; Lakowicz, J. R. Use of a Long-Lifetime Re(I) Complex in Fluorescence Polarization Immunoassays of High-Molecular-Weight Analytes. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 632–637. <https://doi.org/10.1021/ac970827k>.
- (310) Okada, T.; Minoura, N. Fluorescence Emission and Polarization Analyses for Evaluating Binding of Ruthenium Metalloglycoclusters to Lectins and Tetanus Toxin C-Fragment. *J. Biomed. Opt.* **2011**, *16*, 037001. <https://doi.org/10.1117/1.3558727>.
- (311) Li, Y.; Zhang, N.; Wang, H.; Zhao, Q. Fluorescence Anisotropy-Based Signal-Off and Signal-On Aptamer Assays Using Lissamine Rhodamine B as a Label for Ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 4277–4283. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00549>.

- (312) Sun, L.; Zhao, Q. Direct Fluorescence Anisotropy Approach for Aflatoxin B₁ Detection and Affinity Binding Study by Using Single Tetramethylrhodamine Labeled Aptamer. *Talanta* **2018**, *189*, 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.036>.
- (313) Zhang, J.; Li, T.; Zhang, T.; Xue, P.; Guan, T.; Yuan, Y.; Yu, H. Receptor-Based Fluorescence Polarization Assay to Detect Phthalate Esters in Chinese Spirits. *Food Anal. Methods* **2017**, *10*, 1293–1300. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0682-4>.
- (314) Tereshchenkov, A. G.; Shishkina, A. V.; Karpenko, V. V.; Chertkov, V. A.; Konevega, A. L.; Kasatsky, P. S.; Bogdanov, A. A.; Sumbatyan, N. V. New Fluorescent Macrolide Derivatives for Studying Interactions of Antibiotics and Their Analogs with the Ribosomal Exit Tunnel. *Biochem. (Mosc.)* **2016**, *81*, 1163–1172. <https://doi.org/10.1134/S0006297916100138>.
- (315) Tõntson, L.; Kopanchuk, S.; Rinke, A. Characterization of 5-HT_{1A} Receptors and Their Complexes with G-Proteins in Budded Baculovirus Particles Using Fluorescence Anisotropy of Bodipy-FL-NAN-190. *Neurochem. Int.* **2014**, *67*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.01.012>.
- (316) Wang, B.; Ren, D.; You, Z.; Yalikun, Y.; Tanaka, Y. Ultrasensitive Detection of Nucleic Acids Based on Dually Enhanced Fluorescence Polarization. *Analyst* **2018**, *143*, 3560–3569. <https://doi.org/10.1039/C8AN00952J>.
- (317) Jurewicz, M. M.; Willis, R. A.; Ramachandiran, V.; Altman, J. D.; Stern, L. J. MHC-I Peptide Binding Activity Assessed by Exchange after Cleavage of Peptide Covalently Linked to B2-Microglobulin. *Anal. Biochem.* **2019**, *584*, 113328. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.05.017>.
- (318) Rusinova, E.; Tretyachenko-Ladokhina, V.; Vele, O. E.; Senear, D. F.; Alexander Ross, J. B. Alexa and Oregon Green Dyes as Fluorescence Anisotropy Probes for Measuring Protein–Protein and Protein–Nucleic Acid Interactions. *Anal. Biochem.* **2002**, *308*, 18–25. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00325-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00325-1).
- (319) Boes, A.; Olatunji, S.; Mohammadi, T.; Breukink, E.; Terrak, M. Fluorescence Anisotropy Assays for High Throughput Screening of Compounds Binding to Lipid II, PBP1b, FtsW and MurJ. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6280. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63380-2>.
- (320) Chen, J.; Liu, J.; Chen, X.; Qiu, H. Recent Progress in Nanomaterial-Enhanced Fluorescence Polarization/Anisotropy Sensors. *Chin. Chem. Lett.* **2019**, *30*, 1575–1580. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2019.06.005>.
- (321) Tian, J.; Zhou, L.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Peng, Y.; Zhao, S. Multiplexed Detection of Tumor Markers with Multicolor Quantum Dots Based on Fluorescence Polarization Immunoassay. *Talanta* **2012**, *92*, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.01.051>.
- (322) He, Y.; Tian, J.; Hu, K.; Zhang, J.; Chen, S.; Jiang, Y.; Zhao, Y.; Zhao, S. An Ultrasensitive Quantum Dots Fluorescent Polarization Immunoassay Based on the Antibody Modified Au Nanoparticles Amplifying for the Detection of Adenosine Triphosphate. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *802*, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.10.011>.
- (323) Zhang, J.; Tian, J.; He, Y.; Zhao, Y.; Zhao, S. A K⁺-Mediated G-Quadruplex Formation Enhancement Fluorescence Polarization System Based on Quantum Dots for Detection of Hg²⁺ and Biothiols. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 2049–2051. <https://doi.org/10.1039/C3CC49424A>.

- (324) Shokri, E.; Hosseini, M.; Sadeghan, A. A.; Bahmani, A.; Nasiri, N.; Hosseinkhani, S. Virus-Directed Synthesis of Emitting Copper Nanoclusters as an Approach to Simple Tracer Preparation for the Detection of Citrus Tristeza Virus through the Fluorescence Anisotropy Immunoassay. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, *321*, 128634. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128634>.
- (325) Huang, Y.; Liu, X.; Zhang, L.; Hu, K.; Zhao, S.; Fang, B.; Chen, Z.-F.; Liang, H. Nicking Enzyme and Graphene Oxide-Based Dual Signal Amplification for Ultrasensitive Aptamer-Based Fluorescence Polarization Assays. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *63*, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.036>.
- (326) Zhen, S. J.; Xiao, X.; Li, C. H.; Huang, C. Z. An Enzyme-Free DNA Circuit-Assisted Graphene Oxide Enhanced Fluorescence Anisotropy Assay for MicroRNA Detection with Improved Sensitivity and Selectivity. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 8766–8771. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00955>.
- (327) Qi, L.; Fan, Y.-Y.; Wei, H.; Zhang, D.; Zhang, Z.-Q. Graphene Oxide-Enhanced and Proflavine-Probed Fluorescence Polarization Biosensor for Ligand-RNA Interaction Assay. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *257*, 666–671. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.036>.
- (328) Qi, L.; Yan, Z.; Huo, Y.; Hai, X.-M.; Zhang, Z.-Q. MnO₂ Nanosheet-Assisted Ligand-DNA Interaction-Based Fluorescence Polarization Biosensor for the Detection of Ag⁺ Ions. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.093>.
- (329) Chen, J.; Chen, Q.; Gao, C.; Zhang, M.; Qin, B.; Qiu, H. A SiO₂ NP-DNA/Silver Nanocluster Sandwich Structure-Enhanced Fluorescence Polarization Biosensor for Amplified Detection of Hepatitis B Virus DNA. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 964–967. <https://doi.org/10.1039/C4TB01875C>.
- (330) Zhao, J.; Chu, Z.; Jin, X.; Zhao, S. A Fluorescence Polarization Assay for Nucleic Acid Based on the Amplification of Hybridization Chain Reaction and Nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *209*, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.102>.
- (331) Wang, X.; Zou, M.; Huang, H.; Ren, Y.; Li, L.; Yang, X.; Li, N. Gold Nanoparticle Enhanced Fluorescence Anisotropy for the Assay of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Based on Toehold-Mediated Strand-Displacement Reaction. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 569–575. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.09.023>.
- (332) Liu, J.; Yu, J.; Chen, J.; Yang, R.; Shih, K. Signal-Amplification and Real-Time Fluorescence Anisotropy Detection of Apyrase by Carbon Nanoparticle. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *38*, 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.02.001>.
- (333) Guo, J. F.; Li, C. M.; Hu, X. L.; Huang, C. Z.; Li, Y. F. Metal-Organic Framework MIL-101 Enhanced Fluorescence Anisotropy for Sensitive Detection of DNA. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 9379–9382. <https://doi.org/10.1039/C3RA47389A>.
- (334) Stewart, W. W. Lucifer Dyes—Highly Fluorescent Dyes for Biological Tracing. *Nature* **1981**, *292*, 17–21. <https://doi.org/10.1038/292017a0>.
- (335) Stewart, W. W. Synthesis of 3,6-Disulfonated 4-Aminonaphthalimides. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7615–7620. <https://doi.org/10.1021/ja00415a033>.
- (336) Salis, F. *Tesis Doctoral “Development of Luminiscent Techniques for the Enhanced Detection of Immunosuppressants”*; Universidad de Santiago de Compostela, 2018.

- (337) Rurack, K.; Spieles, M. Fluorescence Quantum Yields of a Series of Red and Near-Infrared Dyes Emitting at 600–1000 Nm. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1232–1242. <https://doi.org/10.1021/ac101329h>.
- (338) Grofcsik, A.; Kubinyi, M.; Jones, W. J. Fluorescence Decay Dynamics of Organic Dye Molecules in Solution. *J. Mol. Struct.* **1995**, *348*, 197–200. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(95\)08623-4](https://doi.org/10.1016/0022-2860(95)08623-4).
- (339) Jose, J.; Ueno, Y.; Burgess, K. Water-Soluble Nile Blue Derivatives: Syntheses and Photophysical Properties. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 418–423. <https://doi.org/10.1002/chem.200801104>.
- (340) Lawler, C.; Fayer, M. D. Proton Transfer in Ionic and Neutral Reverse Micelles. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 6024–6034. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b02753>.
- (341) Goutelle, S.; Maurin, M.; Rougier, F.; Barbaut, X.; Bourguignon, L.; Ducher, M.; Maire, P. The Hill Equation: A Review of Its Capabilities in Pharmacological Modelling. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2008**, *22*, 633–648. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x>.
- (342) Somvanshi, P. R.; Venkatesh, K. V. Hill Equation. In *Encyclopedia of Systems Biology*; Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H., Yokota, H., Eds.; Springer: New York, NY, 2013; pp 892–895. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_946.
- (343) Pulido-Tofiño, P.; Barrero-Moreno, J. M.; Pérez-Conde, M. C. Flow-through Fluoroimmunosensor for Isoproturon Determination in Agricultural Foodstuff: Evaluation of Antibody Immobilization on Solid Support. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *417*, 85–94. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00920-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00920-X).
- (344) Ullman, E. F. Homogeneous Immunoassays. In *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*; Wild, D., Ed.; Elsevier: Oxford, 2013; pp 67–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00006-3>.
- (345) ISO 3534-1:1993. “Statistics-Vocabulary and Symbols-Part 1: Probability and General Statistical Terms.”
- (346) European Medicines Agency. ICH M10 on Bioanalytical Method Validation, 2019.
- (347) Gelder, T. van; Domke, I.; Engelmayer, J.; Fijter, H. de; Kuypers, D.; Budde, K.; Koegeer, R.; Luthe, H.; Oellerich, M. Clinical Utility of a New Enzymatic Assay for Determination of Mycophenolic Acid in Comparison With an Optimized LC-MS/MS Method. *Ther. Drug Monit.* **2009**, *31*, 218–223. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31819a05f2>.
- (348) Lamba, V.; Sangkuhl, K.; Sanghavi, K.; Fish, A.; Altman, R. B.; Klein, T. E. PharmGKB Summary: Mycophenolic Acid Pathway. *Pharmacogenet. Genomics* **2014**, *24*, 73–79. <https://doi.org/10.1097/FPC.000000000000010>.
- (349) Oellerich, M.; Armstrong, V. W.; Kahan, B.; Shaw, L.; Holt, D. W.; Yatscoff, R.; Lindholm, A.; Halloran, P.; Gallicano, K.; Wonigeit, K.; Schütz, E.; Schran, H.; Annesley, T. Lake Louise Consensus Conference on Cyclosporin Monitoring in Organ Transplantation: Report of the Consensus Panel. *Ther. Drug Monit.* **1995**, *17*, 642–654.
- (350) Merrigan, S. D.; Kish-Trier, E.; Seegmiller, J. C.; Johnson-Davis, K. L. LC-MS/MS Method for Quantitation of Mycophenolic Acid, Mycophenolic Acid Acyl-Glucuronide, and 7-O-Mycophenolic Acid Glucuronide in Serum. *Clin. Mass Spectrom.* **2017**, *3*, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2017.07.001>.

- (351) Bullingham, R. E. S.; Nicholls, A. J.; Kamm, B. R. Clinical Pharmacokinetics of Mycophenolate Mofetil: *Clin. Pharmacokinet.* **1998**, *34*, 429-455. <https://doi.org/10.2165/00003088-199834060-00002>.
- (352) Willis, C.; Taylor, P. J.; Salm, P.; Tett, S. E.; Pillans, P. I. Quantification of Free Mycophenolic Acid by High-Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **2000**, *748* (1), 151-156. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00273-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00273-5).
- (353) Leenaars, P. P. A. M.; Hendriksen, C. F. M.; de Leeuw, W. A.; Carat, F.; Delahaut, P.; Fischer, R.; Halder, M.; Hanly, W. C.; Hartinger, J.; Hau, J.; Lindblad, E. B.; Nicklas, W.; Outschoorn, I. M.; Stewart-Tull, D. E. S. The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. *Altern. Lab. Anim.* **1999**, *27*, 79-102. <https://doi.org/10.1177/026119299902700106>.
- (354) Peltomaa, R.; Barderas, R.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C. Recombinant Antibodies and Their Use for Food Immunoanalysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03619-7>.
- (355) Gray, A. C.; Sidhu, S. S.; Chandrasekera, P. C.; Hendriksen, C. F. M.; Borrebaeck, C. A. K. Animal-Friendly Affinity Reagents: Replacing the Needless in the Haystack. *Trends in Biotechnology* **2016**, *34*, 960-969. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.05.017>.
- (356) Barroso, J.; Halder, M.; Whelan, M.; Joint Research Centre (European Commission). *EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies*; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2020; Vol. EUR 30185 EN.
- (357) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*. October 20, 2010, p L 276/33.
- (358) Ferrigno, P. K. Non-Antibody Protein-Based Biosensors. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 19-25. <https://doi.org/10.1042/EBC20150003>.
- (359) Bedford, R.; Tiede, C.; Hughes, R.; Curd, A.; McPherson, M. J.; Peckham, M.; Tomlinson, D. C. Alternative Reagents to Antibodies in Imaging Applications. *Biophys. Rev.* **2017**, *9*, 299-308. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0278-2>.
- (360) Ghartey-Kwansah, G.; Li, Z.; Feng, R.; Wang, L.; Zhou, X.; Chen, F. Z.; Xu, M. M.; Jones, O.; Mu, Y.; Chen, S.; Bryant, J.; Isaacs, W. B.; Ma, J.; Xu, X. Comparative Analysis of FKBP Family Protein: Evaluation, Structure, and Function in Mammals and *Drosophila Melanogaster*. *BMC Dev. Biol.* **2018**, *18*. <https://doi.org/10.1186/s12861-018-0167-3>.
- (361) Bonner, J. M.; Boulianne, G. L. Diverse Structures, Functions and Uses of FK506 Binding Proteins. *Cell. Signal.* **2017**, *38*, 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.06.013>.
- (362) DeCenzo, M. T.; Park, S. T.; Jarrett, B. P.; Aldape, R. A.; Futer, O.; Murcko, M. A.; Livingston, D. J. FK506-Binding Protein Mutational Analysis: Defining the Active-Site Residue Contributions to Catalysis and the Stability of Ligand Complexes. *Protein Eng. Des. Sel.* **1996**, *9*, 173-180. <https://doi.org/10.1093/protein/9.2.173>.
- (363) Liu, J.; Farmer, J. D.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L. Calcineurin Is a Common Target of Cyclophilin-Cyclosporin A and FKBP-FK506 Complexes. *Cell* **1991**, *66*, 807-815. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90124-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90124-H).

- (364) General, I. J.; Meirovitch, H. Absolute Free Energy of Binding and Entropy of the FKBP12-FK506 Complex: Effects of the Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 4609–4619. <https://doi.org/10.1021/ct400484u>.
- (365) Yapici, E.; Reddy, D. R.; Miller, L. W. An Adaptable Luminescence Resonance Energy Transfer Assay for Measuring and Screening Protein–Protein Interactions and Their Inhibition. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 553–558. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100710>.
- (366) Küey, C.; Larocque, G.; Clarke, N. I.; Royle, S. J. Unintended Perturbation of Protein Function Using GFP Nanobodies in Human Cells. *J. Cell Sci.* **2019**, *132*, jcs234955. <https://doi.org/10.1242/jcs.234955>.
- (367) Robida, A. M.; Kerppola, T. K. Bimolecular Fluorescence Complementation Analysis of Inducible Protein Interactions: Effects of Factors Affecting Protein Folding on Fluorescent Protein Fragment Association. *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 391–409. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.08.069>.
- (368) Rajendran, M.; Yapici, E.; Miller, L. W. Lanthanide-Based Imaging of Protein–Protein Interactions in Live Cells. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 1839–1853. <https://doi.org/10.1021/ic4018739>.
- (369) Mahendrarajah, K.; Dalby, P. A.; Wilkinson, B.; Jackson, S. E.; Main, E. R. G. A High-Throughput Fluorescence Chemical Denaturation Assay as a General Screen for Protein–Ligand Binding. *Anal. Biochem.* **2011**, *411*, 155–157. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.12.001>.
- (370) Tamura, T.; Kioi, Y.; Miki, T.; Tsukiji, S.; Hamachi, I. Fluorophore Labeling of Native FKBP12 by Ligand-Directed Tosyl Chemistry Allows Detection of Its Molecular Interactions in Vitro and in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6782–6785. <https://doi.org/10.1021/ja401956b>.
- (371) Carpenter, M. A.; Wang, Y.; Telmer, C. A.; Schmidt, B. F.; Yang, Z.; Bruchez, M. P. Protein Proximity Observed Using Fluorogen Activating Protein and Dye Activated by Proximal Anchoring (FAP–DAPA) System. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 2433–2443. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00419>.
- (372) Pomplun, S.; Sippel, C.; Hähle, A.; Tay, D.; Shima, K.; Klages, A.; Ünal, C. M.; Rieß, B.; Toh, H. T.; Hansen, G.; Yoon, H. S.; Bracher, A.; Preiser, P.; Rupp, J.; Steinert, M.; Hausch, F. Chemogenomic Profiling of Human and Microbial FK506-Binding Proteins. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 3660–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00137>.
- (373) Wang, Y.; Kirschner, A.; Fabian, A.-K.; Gopalakrishnan, R.; Kress, C.; Hoogeland, B.; Koch, U.; Kozany, C.; Bracher, A.; Hausch, F. Increasing the Efficiency of Ligands for FK506-Binding Protein 51 by Conformational Control. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3922–3935. <https://doi.org/10.1021/jm400087k>.
- (374) Bizzarri, M.; Tenori, E.; Martina, M. R.; Marsili, S.; Caminati, G.; Menichetti, S.; Procacci, P. New Perspective on How and Why Immunophilin FK506-Related Ligands Work. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 2834–2839. <https://doi.org/10.1021/jz201037u>.
- (375) Martina, M. R.; Tenori, E.; Bizzarri, M.; Menichetti, S.; Caminati, G.; Procacci, P. The Precise Chemical–Physical Nature of the Pharmacore in FK506 Binding Protein Inhibition: ElteX, a New Class of Nanomolar FKBP12 Ligands. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1041–1051. <https://doi.org/10.1021/jm3015052>.

- (376) Kolos, J. M.; Voll, A. M.; Bauder, M.; Hausch, F. FKBP Ligands—Where We Are and Where to Go? *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01425>.
- (377) Murthy, J. N.; Chen, Y.; Warty, V. S.; Venkataramanan, R.; Donnelly, J. G.; Zeevi, A.; Soldin, S. J. Radioreceptor Assay for Quantifying FK-506 Immunosuppressant in Whole Blood. *Clin. Chem.* **1992**, *38*, 1307–1310.
- (378) Liu, J.; Cui, Z. Fluorescent Labeling of Proteins of Interest in Live Cells: Beyond Fluorescent Proteins. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31*, 1587–1595. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00181>.
- (379) Pradanas-González, F.; Glahn-Martínez, B.; Benito-Peña, E.; Arola, H. O.; Nevanen, T. K.; Moreno-Bondi, M. C. Molecular Super-Gluing: A Straightforward Tool for Antibody Labelling and Its Application to Mycotoxin Biosensing. *Anal Bioanal Chem* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03841-3>.
- (380) Toseland, C. P. Fluorescent Labeling and Modification of Proteins. *J. Chem. Biol.* **2013**, *6*, 85–95. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0094-5>.
- (381) Sahoo, H. Fluorescent Labeling Techniques in Biomolecules: A Flashback. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 7017. <https://doi.org/10.1039/c2ra20389h>.
- (382) Takaoka, Y.; Ojida, A.; Hamachi, I. Protein Organic Chemistry and Applications for Labeling and Engineering in Live-Cell Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088–4106. <https://doi.org/10.1002/anie.201207089>.
- (383) Chalker, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Lin, Y. A.; Davis, B. G. Chemical Modification of Proteins at Cysteine: Opportunities in Chemistry and Biology. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 630–640. <https://doi.org/10.1002/asia.200800427>.
- (384) Koniev, O.; Wagner, A. Developments and Recent Advancements in the Field of Endogenous Amino Acid Selective Bond Forming Reactions for Bioconjugation. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5495–5551. <https://doi.org/10.1039/C5CS00048C>.
- (385) Puljung, M. C.; Zagotta, W. N. Labeling of Specific Cysteines in Proteins Using Reversible Metal Protection. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 2513–2521. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.063>.
- (386) Hermanson, G. T. The Chemistry of Reactive Groups. En *Bioconjugate Techniques (Second Edition)*; Hermanson, G. T., Ed.; Academic Press: New York, 2008; pp 169–212. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370501-3.00002-3>.
- (387) Amitani, I.; Liu, B.; Dombrowski, C. C.; Baskin, R. J.; Kowalczykowski, S. C. Watching Individual Proteins Acting on Single Molecules of DNA. En *Methods in Enzymology*; Walter, N. G., Ed.; Single Molecule Tools: Fluorescence Based Approaches, Part A; Academic Press: Cambridge, 2010; Vol. 472, pp 261–291. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)72007-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)72007-3).
- (388) Matos, M. J.; Oliveira, B. L.; Martínez-Sáez, N.; Guerreiro, A.; Cal, P. M. S. D.; Bertoldo, J.; Maneiro, M.; Perkins, E.; Howard, J.; Deery, M. J.; Chalker, J. M.; Corzana, F.; Jiménez-Osés, G.; Bernardes, G. J. L. Chemo- and Regioselective Lysine Modification on Native Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4004–4017. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b12874>.
- (389) Lin, S.; Yang, X.; Jia, S.; Weeks, A. M.; Hornsby, M.; Lee, P. S.; Nichiporuk, R. V.; Iavarone, A. T.; Wells, J. A.; Toste, F. D.; Chang, C. J. Redox-Based Reagents for Chemoselective Methionine Bioconjugation. *Science* **2017**, *355*, 597–602. <https://doi.org/10.1126/science.aal3316>.

- (390) Amaike, K.; Tamura, T.; Hamachi, I. Recognition-Driven Chemical Labeling of Endogenous Proteins in Multi-Molecular Crowding in Live Cells. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 11972–11983. <https://doi.org/10.1039/C7CC07177A>.
- (391) Tsukiji, S.; Miyagawa, M.; Takaoka, Y.; Tamura, T.; Hamachi, I. Ligand-Directed Tosyl Chemistry for Protein Labeling in Vivo. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 341–343. <https://doi.org/10.1038/nchembio.157>.
- (392) Tsukiji, S.; Hamachi, I. Ligand-Directed Tosyl Chemistry for in Situ Native Protein Labeling and Engineering in Living Systems: From Basic Properties to Applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 21, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.07.012>.
- (393) Fujishima, S.; Yasui, R.; Miki, T.; Ojida, A.; Hamachi, I. Ligand-Directed Acyl Imidazole Chemistry for Labeling of Membrane-Bound Proteins on Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 3961–3964. <https://doi.org/10.1021/ja2108855>.
- (394) Tsien, R. Y. The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>.
- (395) Davidson, M. W.; Campbell, R. E. Engineered Fluorescent Proteins: Innovations and Applications. *Nat. Methods* **2009**, 6, 713–717. <https://doi.org/10.1038/nmeth1009-713>.
- (396) Shaner, N. C.; Lin, M. Z.; McKeown, M. R.; Steinbach, P. A.; Hazelwood, K. L.; Davidson, M. W.; Tsien, R. Y. Improving the Photostability of Bright Monomeric Orange and Red Fluorescent Proteins. *Nat. Methods* **2008**, 5, 545–551. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1209>.
- (397) Zacharias, D. A.; Violin, J. D.; Newton, A. C.; Tsien, R. Y. Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* **2002**, 296, 913–916. <https://doi.org/10.1126/science.1068539>.
- (398) Virant, D.; Traenkle, B.; Maier, J.; Kaiser, P. D.; Bodenhöfer, M.; Schmees, C.; Vojnovic, I.; Pisak-Lukáts, B.; Endesfelder, U.; Rothbauer, U. A Peptide Tag-Specific Nanobody Enables High-Quality Labeling for DSTORM Imaging. *Nat. Commun.* **2018**, 9, 930. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03191-2>.
- (399) Bonasio, R.; Carman, C. V.; Kim, E.; Sage, P. T.; Love, K. R.; Mempel, T. R.; Springer, T. A.; von Andrian, U. H. Specific and Covalent Labeling of a Membrane Protein with Organic Fluorochromes and Quantum Dots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 14753–14758. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705201104>.
- (400) Lata, S.; Gavutis, M.; Tampé, R.; Piehler, J. Specific and Stable Fluorescence Labeling of Histidine-Tagged Proteins for Dissecting Multi-Protein Complex Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2365–2372. <https://doi.org/10.1021/ja0563105>.
- (401) Gómez-Arribas, L. N.; Darder, M. del M.; García, N.; Rodríguez, Y.; Urraca, J. L.; Moreno-Bondi, M. C. Hierarchically Imprinted Polymer for Peptide Tag Recognition Based on an Oriented Surface Epitope Approach. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, 12, 49111–49121. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c14846>.
- (402) Ojida, A.; Honda, K.; Shinmi, D.; Kiyonaka, S.; Mori, Y.; Hamachi, I. Oligo-Asp Tag/Zn(II) Complex Probe as a New Pair for Labeling and Fluorescence Imaging of Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10452–10459. <https://doi.org/10.1021/ja0618604>.
- (403) Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y. Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells. *Science* **1998**, 281, 269–272. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.269>.

- (404) *Cell Membrane Nanodomains: From Biochemistry to Nanoscopy*; Cambi, A., Lidke, D. S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2014.
- (405) Adams, S. R.; Campbell, R. E.; Gross, L. A.; Martin, B. R.; Walkup, G. K.; Yao, Y.; Llopis, J.; Tsien, R. Y. New Biarsenical Ligands and Tetracysteine Motifs for Protein Labeling in Vitro and in Vivo: Synthesis and Biological Applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063–6076. <https://doi.org/10.1021/ja017687n>.
- (406) Hatlem, D.; Trunk, T.; Linke, D.; Leo, J. C. Catching a SPY: Using the SpyCatcher-SpyTag and Related Systems for Labeling and Localizing Bacterial Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2129. <https://doi.org/10.3390/ijms20092129>.
- (407) Zakeri, B.; Fierer, J. O.; Celik, E.; Chittock, E. C.; Schwarz-Linek, U.; Moy, V. T.; Howarth, M. Peptide Tag Forming a Rapid Covalent Bond to a Protein, through Engineering a Bacterial Adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, E690–E697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115485109>.
- (408) Aguiño, C. F.; Lang, M.; Fernández-Luna, V.; Pröschel, M.; Sonnewald, U.; Coto, P. B.; Costa, R. D. Single-Component Biohybrid Light-Emitting Diodes Using a White-Emitting Fused Protein. *ACS Omega* **2018**, *3*, 15829–15836. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02226>.
- (409) Sun, X.; Zhang, A.; Baker, B.; Sun, L.; Howard, A.; Buswell, J.; Maurel, D.; Masharina, A.; Johnsson, K.; Noren, C. J.; Xu, M.-Q.; Corrêa Jr., I. R. Development of SNAP-Tag Fluorogenic Probes for Wash-Free Fluorescence Imaging. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2217–2226. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100173>.
- (410) Maurel, D.; Comps-Agrar, L.; Brock, C.; Rives, M.-L.; Bourrier, E.; Ayoub, M. A.; Bazin, H.; Tinel, N.; Durroux, T.; Prézeau, L.; Trinquet, E.; Pin, J.-P. Cell-Surface Protein-Protein Interaction Analysis with Time-Resolved FRET and Snap-Tag Technologies: Application to GPCR Oligomerization. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 561–567. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1213>.
- (411) Merlo, R.; Caprioglio, D.; Cillo, M.; Valenti, A.; Mattosovich, R.; Morrone, C.; Massarotti, A.; Rossi, F.; Miggiano, R.; Leonardi, A.; Minassi, A.; Perugino, G. The SNAP-Tag Technology Revised: An Effective Chemo-Enzymatic Approach by Using a Universal Azide-Based Substrate. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 85–97. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1841182>.
- (412) Bosch, P. J.; Corrêa, I. R.; Sonntag, M. H.; Ibach, J.; Brunsveld, L.; Kanger, J. S.; Subramaniam, V. Evaluation of Fluorophores to Label SNAP-Tag Fused Proteins for Multicolor Single-Molecule Tracking Microscopy in Live Cells. *Biophys. J.* **2014**, *107*, 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.040>.
- (413) Keppler, A.; Pick, H.; Arrivoli, C.; Vogel, H.; Johnsson, K. Labeling of Fusion Proteins with Synthetic Fluorophores in Live Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 9955–9959. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401923101>.
- (414) Gautier, A.; Juillerat, A.; Heinis, C.; Corrêa, I. R.; Kindermann, M.; Beaufils, F.; Johnsson, K. An Engineered Protein Tag for Multiprotein Labeling in Living Cells. *Chemistry & Biology* **2008**, *15*, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.01.007>.
- (415) Los, G. V.; Encell, L. P.; McDougall, M. G.; Hartzell, D. D.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Wood, M. G.; Learish, R.; Ohana, R. F.; Urh, M.; Simpson, D.; Mendez, J.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Vidugiris, G.; Zhu, J.; Darzins, A.; Klaubert, D. H.; Bulleit, R. F.; Wood, K. V.

- HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373–382. <https://doi.org/10.1021/cb800025k>.
- (416) England, C. G.; Luo, H.; Cai, W. HaloTag Technology: A Versatile Platform for Biomedical Applications. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 975–986. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00191>.
- (417) Arsić, A.; Hagemann, C.; Stajković, N.; Schubert, T.; Nikić-Spiegel, I. Minimal Genetically Encoded Tags for Fluorescent Protein Labeling in Living Neurons. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 314. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-27956-y>.
- (418) Hohsaka, T.; Kajihara, D.; Ashizuka, Y.; Murakami, H.; Sisido, M. Efficient Incorporation of Nonnatural Amino Acids with Large Aromatic Groups into Streptavidin in In Vitro Protein Synthesizing Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 34–40. <https://doi.org/10.1021/ja9813109>.
- (419) Taki, M.; Hohsaka, T.; Murakami, H.; Taira, K.; Sisido, M. Position-Specific Incorporation of a Fluorophore–Quencher Pair into a Single Streptavidin through Orthogonal Four-Base Codon/Anticodon Pairs. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14586–14590. <https://doi.org/10.1021/ja017714+>.
- (420) Sisido, M.; Hohsaka, T. Introduction of Specialty Functions by the Position-Specific Incorporation of Nonnatural Amino Acids into Proteins through Four-Base Codon/Anticodon Pairs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57*, 274–281. <https://doi.org/10.1007/s002530100791>.
- (421) De Filippis, V.; De Boni, S.; De Dea, E.; Dalzoppo, D.; Grandi, C.; Fontana, A. Incorporation of the Fluorescent Amino Acid 7-Azatriptophan into the Core Domain 1–47 of Hirudin as a Probe of Hirudin Folding and Thrombin Recognition. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1489–1502. <https://doi.org/10.1110/ps.03542104>.
- (422) Sugimura, Y.; Hosono, M.; Wada, F.; Yoshimura, T.; Maki, M.; Hitomi, K. Screening for the Preferred Substrate Sequence of Transglutaminase Using a Phage-Displayed Peptide Library: IDENTIFICATION OF PEPTIDE SUBSTRATES FOR TGASE 2 AND FACTOR XIIIa. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17699–17706. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513538200>.
- (423) Perry, A. M.; Ton-That, H.; Mazmanian, S. K.; Schneewind, O. Anchoring of Surface Proteins to the Cell Wall of Staphylococcus Aureus: III. LIPID II IS AN IN VIVO PEPTIDOGLYCAN SUBSTRATE FOR SORTASE-CATALYZED SURFACE PROTEIN ANCHORING*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 16241–16248. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109194200>.
- (424) Dawson, P. E.; Kent, S. B. H. Synthesis of Native Proteins by Chemical Ligation. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.923>.
- (425) Alivisatos, A. P.; Gu, W.; Larabell, C. Quantum Dots as Cellular Probes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2005**, *7*, 55–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.7.060804.100432>.
- (426) Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science* **2005**, *307*, 538–544. <https://doi.org/10.1126/science.1104274>.
- (427) Ng, S. M. Carbon Dots as Optical Nanoprobes for Biosensors. En *Nanobiosensors for Biomolecular Targeting*; Gopinath, S. C. B., Lakshmi Priya, T., Eds.; Micro and Nano Technologies; Elsevier: Amsterdam, 2019; pp 269–300. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813900-4.00012-9>.

- (428) Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Physiol.* **1962**, *59*, 223–239. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>.
- (429) Zimmer, M. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 759–782. <https://doi.org/10.1021/cr010142r>.
- (430) Rao, B. D. N.; Kemple, M. D.; Prendergast, F. G. Proton Nuclear Magnetic Resonance and Fluorescence Spectroscopic Studies of Segmental Mobility in Aequorin and a Green Fluorescent Protein from Aequorea Forskalea. *Biophys. J.* **1980**, *32*, 630–632. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(80\)84999-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(80)84999-X).
- (431) Labas, Y. A.; Gurskaya, N. G.; Yanushevich, Y. G.; Fradkov, A. F.; Lukyanov, K. A.; Lukyanov, S. A.; Matz, M. V. Diversity and Evolution of the Green Fluorescent Protein Family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 4256–4261. <https://doi.org/10.1073/pnas.062552299>.
- (432) Heim, R.; Prasher, D. C.; Tsien, R. Y. Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 12501–12504. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12501>.
- (433) Gross, L. A.; Baird, G. S.; Hoffman, R. C.; Baldridge, K. K.; Tsien, R. Y. The Structure of the Chromophore within DsRed, a Red Fluorescent Protein from Coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 11990–11995. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.11990>.
- (434) Chudakov, D. M.; Matz, M. V.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K. A. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>.
- (435) FPbase: The Fluorescent Protein Database <https://www.fpbases.org/>.
- (436) Pakhomov, A. A.; Martynov, V. I. GFP Family: Structural Insights into Spectral Tuning. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 755–764. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.07.009>.
- (437) Kremers, G.-J.; Gilbert, S. G.; Cranfill, P. J.; Davidson, M. W.; Piston, D. W. Fluorescent Proteins at a Glance. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 157–160. <https://doi.org/10.1242/jcs.072744>.
- (438) Nienhaus, K.; Nienhaus, G. U. Chromophore Photophysics and Dynamics in Fluorescent Proteins of the GFP Family. *J. Phys.: Condens. Matter* **2016**, *28*, 443001. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/28/44/443001>.
- (439) Costantini, L. M.; Balaban, M.; Markwardt, M. L.; Rizzo, M.; Guo, F.; Verkhusha, V. V.; Snapp, E. L. A Palette of Fluorescent Proteins Optimized for Diverse Cellular Environments. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7670. <https://doi.org/10.1038/ncomms8670>.
- (440) Miyawaki, A.; Shcherbakova, D. M.; Verkhusha, V. V. Red Fluorescent Proteins: Chromophore Formation and Cellular Applications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.09.002>.
- (441) Subach, F. V.; Zhang, L.; Gadella, T. W. J.; Gurskaya, N. G.; Lukyanov, K. A.; Verkhusha, V. V. Red Fluorescent Protein with Reversibly Photoswitchable Absorbance for Photochromic FRET. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 745–755. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.05.022>.
- (442) Peltomaa, R.; Amaro-Torres, F.; Carrasco, S.; Orellana, G.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C. Homogeneous Quenching Immunoassay for Fumonisin B1 Based on Gold

- Nanoparticles and an Epitope-Mimicking Yellow Fluorescent Protein. *ACS Nano* **2018**, *12*, 11333–11342. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8bo6094>.
- (443) Peltomaa, R.; Agudo-Maestro, I.; Más, V.; Barderas, R.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C. Development and Comparison of Mimotope-Based Immunoassays for the Analysis of Fumonisin B₁. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 6801–6811. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02068-7>.
- (444) Heim, R.; Tsien, R. Y. Engineering Green Fluorescent Protein for Improved Brightness, Longer Wavelengths and Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 178–182. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00450-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00450-5).
- (445) Cubitt, A. B.; Woollenweber, L. A.; Heim, R. Understanding Structure–Function Relationships in the *Aequorea Victoria* Green Fluorescent Protein. En *Methods in Cell Biology*; Sullivan, K. F., Kay, S. A., Eds.; Green Fluorescent Proteins; Academic Press: San Diego, 1998; Vol. 58, pp 19–30. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61946-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61946-9).
- (446) Feynman, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. *Eng. Sci. Mag.* **1960**, *23*, 22–36.
- (447) Fu, S.; Zhang, X.; Xie, Y.; Wu, J.; Ju, H. An Efficient Enzyme-Powered Micromotor Device Fabricated by Cyclic Alternate Hybridization Assembly for DNA Detection. *Nanoscale* **2017**, *9*, 9026–9033. <https://doi.org/10.1039/C7NR01168G>.
- (448) Xin, C.; Yang, L.; Li, J.; Hu, Y.; Qian, D.; Fan, S.; Hu, K.; Cai, Z.; Wu, H.; Wang, D.; Wu, D.; Chu, J. Conical Hollow Microhelices with Superior Swimming Capabilities for Targeted Cargo Delivery. *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1808226. <https://doi.org/10.1002/adma.201808226>.
- (449) Schauer, O.; Mostaghaci, B.; Colin, R.; Hürtgen, D.; Kraus, D.; Sitti, M.; Sourjik, V. Motility and Chemotaxis of Bacteria-Driven Microswimmers Fabricated Using Antigen 43-Mediated Biotin Display. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9801. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28102-9>.
- (450) Medina-Sánchez, M.; Schwarz, L.; Meyer, A. K.; Hebenstreit, F.; Schmidt, O. G. Cellular Cargo Delivery: Toward Assisted Fertilization by Sperm-Carrying Micromotors. *Nano Lett.* **2016**, *16*, 555–561. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5bo4221>.
- (451) Zhou, M.; Hou, T.; Li, J.; Yu, S.; Xu, Z.; Yin, M.; Wang, J.; Wang, X. Self-Propelled and Targeted Drug Delivery of Poly(Aspartic Acid)/Iron–Zinc Microrocket in the Stomach. *ACS Nano* **2019**, *13*, 1324–1332. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8bo6773>.
- (452) Engay, E.; Bunea, A.-I.; Chouliara, M.; Bañas, A.; Glückstad, J. Natural Convection Induced by an Optically Fabricated and Actuated Microtool with a Thermoplasmonic Disk. *Opt. Lett.* **2018**, *43*, 3870–3873. <https://doi.org/10.1364/OL.43.003870>.
- (453) Baeza, A.; Vallet-Regí, M. Nanomotors for Nucleic Acid, Proteins, Pollutants and Cells Detection. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1579. <https://doi.org/10.3390/ijms19061579>.
- (454) Baker, R.; Brooks, A. M.; Sen, A. Designing Proteus: Engineering Form and Function for Microrobotics. En *Robotic Systems and Autonomous Platforms*; Walsh, S. M., Strano, M. S., Eds.; Woodhead Publishing in Materials; Woodhead Publishing: Cambridge, 2019; pp 85–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102260-3.00005-6>.
- (455) Golestanian, R.; Liverpool, T. B.; Ajdari, A. Propulsion of a Molecular Machine by Asymmetric Distribution of Reaction Products. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 220801. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.94.220801>.

- (456) Howse, J. R.; Jones, R. A. L.; Ryan, A. J.; Gough, T.; Vafabakhsh, R.; Golestanian, R. Self-Motile Colloidal Particles: From Directed Propulsion to Random Walk. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99*, 048102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.048102>.
- (457) Wrede, P.; Medina-Sánchez, M.; Fomin, V. M.; Schmidt, O. G. Switching Propulsion Mechanisms of Tubular Catalytic Micromotors. *Small* **2021**, *17*, 2006449. <https://doi.org/10.1002/sml.202006449>.
- (458) Marx, A.; Hoenger, A.; Mandelkow, E. Structures of Kinesin Motor Proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* **2009**, *66*, 958–966. <https://doi.org/10.1002/cm.20392>.
- (459) Guix, M.; Mayorga-Martinez, C. C.; Merkoçi, A. Nano/Micromotors in (Bio)Chemical Science Applications. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6285–6322. <https://doi.org/10.1021/cr400273r>.
- (460) Yuan, K.; Jiang, Z.; Jurado-Sánchez, B.; Escarpa, A. Nano/Micromotors for Diagnosis and Therapy of Cancer and Infectious Diseases. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 2309–2326. <https://doi.org/10.1002/chem.201903475>.
- (461) Bunea, A.-I.; Taboryski, R. Recent Advances in Microswimmers for Biomedical Applications. *Micromachines* **2020**, *11*, 1048. <https://doi.org/10.3390/mi11121048>.
- (462) Orozco, J.; Jurado-Sánchez, B.; Wagner, G.; Gao, W.; Vazquez-Duhalt, R.; Sattayasamitsathit, S.; Galarnyk, M.; Cortés, A.; Saintillan, D.; Wang, J. Bubble-Propelled Micromotors for Enhanced Transport of Passive Tracers. *Langmuir* **2014**, *30*, 5082–5087. <https://doi.org/10.1021/la500819r>.
- (463) Wang, H.; Pumera, M. Fabrication of Micro/Nanoscale Motors. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8704–8735. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00047>.
- (464) Anderson, J. L. Transport Mechanisms of Biological Colloids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1986**, *469*, 166–177. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb26495.x>.
- (465) Paxton, W. F.; Kistler, K. C.; Olmeda, C. C.; Sen, A.; St. Angelo, S. K.; Cao, Y.; Mallouk, T. E.; Lammert, P. E.; Crespi, V. H. Catalytic Nanomotors: Autonomous Movement of Striped Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13424–13431. <https://doi.org/10.1021/ja047697z>.
- (466) Paxton, W. F.; Baker, P. T.; Kline, T. R.; Wang, Y.; Mallouk, T. E.; Sen, A. Catalytically Induced Electrokinetics for Motors and Micropumps. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14881–14888. <https://doi.org/10.1021/ja0643164>.
- (467) Golestanian, R.; Liverpool, T. B.; Ajdari, A. Designing Phoretic Micro- and Nano-Swimmers. *New J. Phys.* **2007**, *9*, 126–126. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/9/5/126>.
- (468) Mei, Y.; Huang, G.; Solovev, A. A.; Ureña, E. B.; Mönch, I.; Ding, F.; Reindl, T.; Fu, R. K. Y.; Chu, P. K.; Schmidt, O. G. Versatile Approach for Integrative and Functionalized Tubes by Strain Engineering of Nanomembranes on Polymers. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4085–4090. <https://doi.org/10.1002/adma.200801589>.
- (469) Ma, X.; Jang, S.; Popescu, M. N.; Uspal, W. E.; Miguel-López, A.; Hahn, K.; Kim, D.-P.; Sánchez, S. Reversed Janus Micro/Nanomotors with Internal Chemical Engine. *ACS Nano* **2016**, *10*, 8751–8759. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b04358>.
- (470) Manjare, M.; Yang, B.; Zhao, Y.-P. Bubble Driven Quasioscillatory Translational Motion of Catalytic Micromotors. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *109*, 128305. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.128305>.

- (471) Ma, X.; Wang, X.; Hahn, K.; Sánchez, S. Motion Control of Urea-Powered Biocompatible Hollow Microcapsules. *ACS Nano* **2016**, *10*, 3597–3605. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5bo8067>.
- (472) Ma, X.; Jannasch, A.; Albrecht, U.-R.; Hahn, K.; Miguel-López, A.; Schäffer, E.; Sánchez, S. Enzyme-Powered Hollow Mesoporous Janus Nanomotors. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 7043–7050. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5bo3100>.
- (473) Sengupta, S.; Patra, D.; Ortiz-Rivera, I.; Agrawal, A.; Shklyae, S.; Dey, K. K.; Córdova-Figueroa, U.; Mallouk, T. E.; Sen, A. Self-Powered Enzyme Micropumps. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 415–422. <https://doi.org/10.1038/nchem.1895>.
- (474) Hong, Y.; Diaz, M.; Córdova-Figueroa, U. M.; Sen, A. Light-Driven Titanium-Dioxide-Based Reversible Microfireworks and Micromotor/Micropump Systems. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 1568–1576. <https://doi.org/10.1002/adfm.201000063>.
- (475) Wong, F.; Sen, A. Progress toward Light-Harvesting Self-Electrophoretic Motors: Highly Efficient Bimetallic Nanomotors and Micropumps in Halogen Media. *ACS Nano* **2016**, *10*, 7172–7179. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6bo3474>.
- (476) Dong, R.; Zhang, Q.; Gao, W.; Pei, A.; Ren, B. Highly Efficient Light-Driven TiO₂-Au Janus Micromotors. *ACS Nano* **2016**, *10*, 839–844. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5bo5940>.
- (477) Dai, B.; Wang, J.; Xiong, Z.; Zhan, X.; Dai, W.; Li, C.-C.; Feng, S.-P.; Tang, J. Programmable Artificial Phototactic Microswimmer. *Nat. Nanotech.* **2016**, *11*, 1087–1092. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.187>.
- (478) Gao, W.; Sattayasamitsathit, S.; Manesh, K. M.; Weihs, D.; Wang, J. Magnetically Powered Flexible Metal Nanowire Motors. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14403–14405. <https://doi.org/10.1021/ja1072349>.
- (479) Zhang, L.; Abbott, J. J.; Dong, L.; Kratochvil, B. E.; Bell, D.; Nelson, B. J. Artificial Bacterial Flagella: Fabrication and Magnetic Control. *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *94*, 064107. <https://doi.org/10.1063/1.3079655>.
- (480) Gangwal, S.; Cayre, O. J.; Bazant, M. Z.; Velez, O. D. Induced-Charge Electrophoresis of Metallo-dielectric Particles. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 058302. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.100.058302>.
- (481) Wang, W.; Castro, L. A.; Hoyos, M.; Mallouk, T. E. Autonomous Motion of Metallic Microrods Propelled by Ultrasound. *ACS Nano* **2012**, *6*, 6122–6132. <https://doi.org/10.1021/nn301312z>.
- (482) Ahmed, S.; Wang, W.; Mair, L. O.; Fraleigh, R. D.; Li, S.; Castro, L. A.; Hoyos, M.; Huang, T. J.; Mallouk, T. E. Steering Acoustically Propelled Nanowire Motors toward Cells in a Biologically Compatible Environment Using Magnetic Fields. *Langmuir* **2013**, *29*, 16113–16118. <https://doi.org/10.1021/la403946j>.
- (483) Burdick, J.; Laocharoensuk, R.; Wheat, P. M.; Posner, J. D.; Wang, J. Synthetic Nanomotors in Microchannel Networks: Directional Microchip Motion and Controlled Manipulation of Cargo. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8164–8165. <https://doi.org/10.1021/ja803529u>.
- (484) Wang, W.; Duan, W.; Zhang, Z.; Sun, M.; Sen, A.; Mallouk, T. E. A Tale of Two Forces: Simultaneous Chemical and Acoustic Propulsion of Bimetallic Micromotors. *Chem. Commun.* **2014**, *51*, 1020–1023. <https://doi.org/10.1039/C4CC09149C>.

- (485) Serrà, A.; García-Torres, J. Electrochemistry: A Basic and Powerful Tool for Micro- and Nanomotor Fabrication and Characterization. *Appl. Mater. Today* **2021**, *22*, 100939. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.100939>.
- (486) Xia, Y.; Yang, P.; Sun, Y.; Wu, Y.; Mayers, B.; Gates, B.; Yin, Y.; Kim, F.; Yan, H. One-Dimensional Nanostructures: Synthesis, Characterization, and Applications. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 353–389. <https://doi.org/10.1002/adma.200390087>.
- (487) Martin, C. R. Nanomaterials: A Membrane-Based Synthetic Approach. *Science* **1994**, *266*, 1961–1966. <https://doi.org/10.1126/science.266.5193.1961>.
- (488) Martin, B. R.; Dermody, D. J.; Reiss, B. D.; Fang, M.; Lyon, L. A.; Natan, M. J.; Mallouk, T. E. Orthogonal Self-Assembly on Colloidal Gold-Platinum Nanorods. *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 1021–1025. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(199908\)11:12<1021::AID-ADMA1021>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(199908)11:12<1021::AID-ADMA1021>3.0.CO;2-S).
- (489) Liu, L.; Yoo, S.-H.; Lee, S. A.; Park, S. Wet-Chemical Synthesis of Palladium Nanosprings. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 3979–3982. <https://doi.org/10.1021/nl202332x>.
- (490) Xu, T.; Gao, W.; Xu, L.-P.; Zhang, X.; Wang, S. Fuel-Free Synthetic Micro-/Nanomachines. *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1603250. <https://doi.org/10.1002/adma.201603250>.
- (491) Kim, S.; Qiu, F.; Kim, S.; Ghanbari, A.; Moon, C.; Zhang, L.; Nelson, B. J.; Choi, H. Fabrication and Characterization of Magnetic Microrobots for Three-Dimensional Cell Culture and Targeted Transportation. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5863–5868. <https://doi.org/10.1002/adma.201301484>.
- (492) Suter, M.; Zhang, L.; Siringil, E. C.; Peters, C.; Luehmann, T.; Ergeneman, O.; Peyer, K. E.; Nelson, B. J.; Hierold, C. Superparamagnetic Microrobots: Fabrication by Two-Photon Polymerization and Biocompatibility. *Biomed. Microdevices* **2013**, *15*, 997–1003. <https://doi.org/10.1007/s10544-013-9791-7>.
- (493) Ye, Y.; Luan, J.; Wang, M.; Chen, Y.; Wilson, D. A.; Peng, F.; Tu, Y. Fabrication of Self-Propelled Micro- and Nanomotors Based on Janus Structures. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 8663–8680. <https://doi.org/10.1002/chem.201900840>.
- (494) Aghamiri, S.; Rabiee, N.; Ahmadi, S.; Rabiee, M.; Bagherzadeh, M.; Karimi, M. Microfluidic Devices: Synthetic Approaches. En *Biomedical Applications of Microfluidic Devices*; Hamblin, M. R., Karimi, M., Eds.; Academic Press: Cambridge, 2021; pp 23–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818791-3.00003-6>.
- (495) Hawkeye, M. M.; Brett, M. J. Glancing Angle Deposition: Fabrication, Properties, and Applications of Micro- and Nanostructured Thin Films. *J. Vac. Sci. Technol.* **2007**, *25*, 1317–1335. <https://doi.org/10.1116/1.2764082>.
- (496) Gibbs, J. G.; Zhao, Y.-P. Design and Characterization of Rotational Multicomponent Catalytic Nanomotors. *Small* **2009**, *5*, 2304–2308. <https://doi.org/10.1002/sml.200900686>.
- (497) He, Y.; Wu, J.; Zhao, Y. Designing Catalytic Nanomotors by Dynamic Shadowing Growth. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1369–1375. <https://doi.org/10.1021/nl070461j>.
- (498) Gibbs, J. G.; Mark, A. G.; Lee, T.-C.; Eslami, S.; Schamel, D.; Fischer, P. Nanohelices by Shadow Growth. *Nanoscale* **2014**, *6*, 9457–9466. <https://doi.org/10.1039/C4NR00403E>.

- (499) Mei, Y.; Solovev, A. A.; Sanchez, S.; Schmidt, O. G. Rolled-up Nanotech on Polymers: From Basic Perception to Self-Propelled Catalytic Microengines. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2109–2119. <https://doi.org/10.1039/CoCS00078G>.
- (500) Zhang, L.; Abbott, J. J.; Dong, L.; Peyer, K. E.; Kratochvil, B. E.; Zhang, H.; Bergeles, C.; Nelson, B. J. Characterizing the Swimming Properties of Artificial Bacterial Flagella. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 3663–3667. <https://doi.org/10.1021/nl901869j>.
- (501) Mei, Y.; Thurmer, D. J.; Cavallo, F.; Kiravittaya, S.; Schmidt, O. G. Semiconductor Sub-Micro-/ Nanochannel Networks by Deterministic Layer Wrinkling. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 2124–2128. <https://doi.org/10.1002/adma.200601622>.
- (502) Jurado-Sánchez, B.; Pacheco, M.; Maria-Hormigos, R.; Escarpa, A. Perspectives on Janus Micromotors: Materials and Applications. *Appl. Mater. Today* **2017**, *9*, 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.09.005>.
- (503) Pacheco, M.; López, M. Á.; Jurado-Sánchez, B.; Escarpa, A. Self-Propelled Micromachines for Analytical Sensing: A Critical Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 6561–6573. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02070-z>.
- (504) Loget, G.; Kuhn, A. Bulk Synthesis of Janus Objects and Asymmetric Patchy Particles. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 15457–15474. <https://doi.org/10.1039/C2JM31740K>.
- (505) Yang, Y.; Fang, Z.; Chen, X.; Zhang, W.; Xie, Y.; Chen, Y.; Liu, Z.; Yuan, W. An Overview of Pickering Emulsions: Solid-Particle Materials, Classification, Morphology, and Applications. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00287>.
- (506) Walther, A.; Drechsler, M.; Rosenfeldt, S.; Harnau, L.; Ballauff, M.; Abetz, V.; Müller, A. H. E. Self-Assembly of Janus Cylinders into Hierarchical Superstructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4720–4728. <https://doi.org/10.1021/ja808614q>.
- (507) Loget, G.; Zigah, D.; Bouffier, L.; Sojic, N.; Kuhn, A. Bipolar Electrochemistry: From Materials Science to Motion and Beyond. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2513–2523. <https://doi.org/10.1021/ar400039k>.
- (508) Gibson, D. G.; Young, L.; Chuang, R.-Y.; Venter, J. C.; Hutchison, C. A.; Smith, H. O. Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- (509) Ahmed, H. *Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization*; CRC Press: Florida, 2005.
- (510) ExPASy ProtParam <http://web.expasy.org/protparam/>.
- (511) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680ao>.
- (512) Gambinossi, F.; Lorenzelli, L.; Baglioni, P.; Caminati, G. Silicon Oxide Surface Functionalization by Self-Assembled Nanolayers for Microcantilever Transducers. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp* **2008**, *321*, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.01.030>.
- (513) Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z. Physik* **1959**, *155*, 206–222. <https://doi.org/10.1007/BF01337937>.
- (514) Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B. Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach. *Phys. Scr.* **1999**, *59*, 391. <https://doi.org/10.1238/Physica.Regular.059a00391>.

- (515) Banchelli, M.; Gambinossi, F.; Durand, A.; Caminati, G.; Brown, T.; Berti, D.; Baglioni, P. Modulation of Density and Orientation of Amphiphilic DNA on Phospholipid Membranes. II. Vesicles. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 7348–7358. <https://doi.org/10.1021/jp100731c>.
- (516) Cañadas, O.; Sáenz, A.; Orellana, G.; Casals, C. Equilibrium Studies of a Fluorescent Tacrolimus Binding to Surfactant Protein A. *Anal. Biochem.* **2005**, *340*, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.01.056>.
- (517) Pathak, S.; Regmi, S.; Gupta, B.; Poudel, B. K.; Pham, T. T.; Yong, C. S.; Kim, J. O.; Kim, J.-R.; Park, M. H.; Bae, Y. K.; Yook, S.; Ahn, C.-H.; Jeong, J.-H. Single Synchronous Delivery of FK506-Loaded Polymeric Microspheres with Pancreatic Islets for the Successful Treatment of Streptozocin-Induced Diabetes in Mice. *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 1350–1359. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1377317>.
- (518) Allen, C.; Eisenberg, A.; Mrcic, J.; Maysinger, D. PCL-b-PEO Micelles as a Delivery Vehicle for FK506: Assessment of a Functional Recovery of Crushed Peripheral Nerve. *Drug Deliv.* **2000**, *7*, 139–145. <https://doi.org/10.1080/10717540050120179>.
- (519) Jurado-Sánchez, B.; Pacheco, M.; Rojo, J.; Escarpa, A. Magnetocatalytic Graphene Quantum Dots Janus Micromotors for Bacterial Endotoxin Detection. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 6957–6961. <https://doi.org/10.1002/anie.201701396>.
- (520) Causa, F.; Battista, E.; Della Moglie, R.; Guarnieri, D.; Iannone, M.; Netti, P. A. Surface Investigation on Biomimetic Materials to Control Cell Adhesion: The Case of RGD Conjugation on PCL. *Langmuir* **2010**, *26*, 9875–9884. <https://doi.org/10.1021/la100207q>.
- (521) Yuan, S.; Xiong, G.; Wang, X.; Zhang, S.; Choong, C. Surface Modification of Polycaprolactone Substrates Using Collagen-Conjugated Poly(Methacrylic Acid) Brushes for the Regulation of Cell Proliferation and Endothelialisation. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 13039–13049. <https://doi.org/10.1039/c2jm31213a>.
- (522) Baltus, R. E.; Carmon, K. S.; Luck, L. A. Quartz Crystal Microbalance (QCM) with Immobilized Protein Receptors: Comparison of Response to Ligand Binding for Direct Protein Immobilization and Protein Attachment via Disulfide Linker. *Langmuir* **2007**, *23*, 3880–3885. <https://doi.org/10.1021/la0628468>.
- (523) Ueda, E. K. M.; Gout, P. W.; Morganti, L. Current and Prospective Applications of Metal Ion-Protein Binding. *J. Chromatogr. A* **2003**, *988*, 1–23. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)02057-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)02057-5).
- (524) Raghunath, G.; Dyer, R. B. Kinetics of Histidine-Tagged Protein Association to Nickel-Decorated Liposome Surfaces. *Langmuir* **2019**, *35*, 12550–12561. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01700>.
- (525) Dorn, I. T.; Pawlitschko, K.; Pettinger, S. C.; Tampé, R. Orientation and Two-Dimensional Organization of Proteins at Chelator Lipid Interfaces. *Biol. Chem.* **1998**, *379*, 1151–1160. <https://doi.org/10.1515/bchm.1998.379.8-9.1151>.
- (526) ExPASy Swiss Model <https://swissmodel.expasy.org/>.
- (527) Liu, H.-L.; Ho, Y.; Hsu, C.-M. Molecular Simulations to Determine the Chelating Mechanisms of Various Metal Ions to the His-Tag Motif: A Preliminary Study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2003**, *21*, 31–41. <https://doi.org/10.1080/07391102.2003.10506903>.
- (528) Valenti, L. E.; De Pauli, C. P.; Giacomelli, C. E. The Binding of Ni(II) Ions to Hexahistidine as a Model System of the Interaction between Nickel and His-Tagged Proteins. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.11.003>.

- (529) Todd, R. J.; Johnson, R. D.; Arnold, F. H. Multiple-Site Binding Interactions in Metal-Affinity Chromatography: I. Equilibrium Binding of Engineered Histidine-Containing Cytochromes c. *J. Chromatogr. A* **1994**, *662*, 13–26. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)85291-X](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)85291-X).
- (530) Johnson, R. D.; Todd, R. J.; Arnold, F. H. Multipoint Binding in Metal-Affinity Chromatography II. Effect of PH and Imidazole on Chromatographic Retention of Engineered Histidine-Containing Cytochromes c. *J. Chromatogr. A* **1996**, *725*, 225–235. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00992-2](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00992-2).
- (531) Hochuli, E.; Bannwarth, W.; Döbeli, H.; Gentz, R.; Stüber, D. Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Bio/Technol.* **1988**, *6*, 1321–1325. <https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321>.
- (532) Knecht, S.; Ricklin, D.; Eberle, A. N.; Ernst, B. Oligohis-Tags: Mechanisms of Binding to Ni²⁺-NTA Surfaces. *J. Mol. Recognit.* **2009**, *22*, 270–279. <https://doi.org/10.1002/jmr.941>.
- (533) Weiwad, M.; Edlich, F.; Kilka, S.; Erdmann, F.; Jarczowski, F.; Dorn, M.; Moutty, M.-C.; Fischer, G. Comparative Analysis of Calcineurin Inhibition by Complexes of Immunosuppressive Drugs with Human FK506 Binding Proteins. *Biochemistry* **2006**, *45*, 15776–15784. <https://doi.org/10.1021/bio61616p>.
- (534) Olivieri, L.; Gardebien, F. Structure-Affinity Properties of a High-Affinity Ligand of FKBP12 Studied by Molecular Simulations of a Binding Intermediate. *PLoS One* **2014**, *9*, e114610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114610>.
- (535) Salinas Rodríguez, B. Síntesis y funcionalización covalente de nanopartículas superparamagnéticas para imagen biomédica. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2014.
- (536) Sabo, A.-N.; Jannier, S.; Becker, G.; Lessinger, J.-M.; Entz-Werlé, N.; Kemmel, V. Sirolimus Pharmacokinetics Variability Points to the Relevance of Therapeutic Drug Monitoring in Pediatric Oncology. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 470. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040470>.
- (537) Kuralay, F.; Sattayasamitsathit, S.; Gao, W.; Uygun, A.; Katzenberg, A.; Wang, J. Self-Propelled Carbohydrate-Sensitive Microtransporters with Built-In Boronic Acid Recognition for Isolating Sugars and Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15217–15220. <https://doi.org/10.1021/ja30608ot>.
- (538) Rahman, Md. M.; Ara, M. G.; Alim, M. A.; Uddin, Md. S.; Najda, A.; Albadrani, G. M.; Sayed, A. A.; Mousa, S. A.; Abdel-Daim, M. M. Mesoporous Carbon: A Versatile Material for Scientific Applications. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 4498. <https://doi.org/10.3390/ijms22094498>.
- (539) Kim, N. H.; Kuila, T.; Lee, J. H. Simultaneous Reduction, Functionalization and Stitching of Graphene Oxide with Ethylenediamine for Composites Application. *J. Mater. Chem. A* **2013**, *1*, 1349–1358. <https://doi.org/10.1039/C2TA00853J>.
- (540) Ramanathan, T.; Fisher, F. T.; Ruoff, R. S.; Brinson, L. C. Amino-Functionalized Carbon Nanotubes for Binding to Polymers and Biological Systems. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1290–1295. <https://doi.org/10.1021/cm048357f>.
- (541) Liu, S.; Li, D.; Wang, L.; Yang, H.; Han, X.; Liu, B. Ethylenediamine-Functionalized Graphene Oxide Incorporated Acid-Base Ion Exchange Membranes for Vanadium Redox

- Flow Battery. *Electrochim. Acta* **2017**, *230*, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.01.170>.
- (542) Veríssimo, N. V.; Saponi, C. F.; Ryan, T. M.; Greaves, T. L.; Pereira, J. F. B. Imidazolium-Based Ionic Liquids as Additives to Preserve the Enhanced Green Fluorescent Protein Fluorescent Activity. *GreenChE* **2021**, *2*, 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.gce.2021.08.001>.
- (543) Fan, L.-J.; Jones, W. E. A Highly Selective and Sensitive Inorganic/Organic Hybrid Polymer Fluorescence “Turn-on” Chemosensory System for Iron Cations. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6784–6785. <https://doi.org/10.1021/ja0612697>.

