

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 624**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/544** (2006.01)

**G01N 33/531** (2006.01)

**C07K 16/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2014 PCT/CN2014/085316**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15143834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2014 E 14887513 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3124973**

54 Título: **Inmunoabsorbente y columna de inmunoafinidad de nanocuerpos de aflatoxina y método de preparación y uso del mismo**

30 Prioridad:

**28.03.2014 CN 201410121834**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.07.2019**

73 Titular/es:

**OILCROPS RESEARCH INSTITUTE OF CHINESE  
ACADEMY OF AGRICULTURE SCIENCES**

**(100.0%)**

**No2 Xudong Second Road  
WuchangWuhan Hubei430062, CN**

72 Inventor/es:

**LI, PEIWU;  
ZHANG, QI;  
WANG, YANRU;  
ZHANG, ZHAOWEI y  
DING, XIAOXIA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 718 624 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inmunoabsorbente y columna de inmutuafinidad de nanocuerpos de aflatoxina y método de preparación y uso del mismo.

**Campo técnico**

- 5 La presente divulgación se refiere a un inmunoabsorbente y a una columna de inmutuafinidad de anticuerpos de cadena pesada de aflatoxina, así como el método de preparación y uso de los mismos.

**Antecedentes técnicos**

10 Las aflatoxinas, metabolitos secundarios producidos por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, son compuestos naturales tóxicos que pueden provocar diversos daños a los seres humanos y al ganado. Hasta el momento, se ha descubierto más de 20 variedades de aflatoxinas, entre las que se incluye aflatoxina B1 (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B2 (AFB<sub>2</sub>), AFG, y M1 (AFM<sub>1</sub>). Entre estos, AFB<sub>1</sub> tiene la toxicidad más fuerte. La toxicidad de AFB<sub>1</sub> es 10 veces la del cianuro de potasio y 68 veces la del arsénico. A principios de 1993, la AFB<sub>1</sub> se categorizó como uno de los químicos carcinogénicos más potentes conocidos por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, es decir, carcinógeno de clase I. China es más gravemente contaminada por la aflatoxina, que 15 puede existir incluso en diversos productos alimentarios y agrícolas, especialmente en maíz, cacahuete y sus productos. Por lo tanto, es significativo reforzar la detección, especialmente la rápida detección, de aflatoxina para controlar la información sobre la salud de diversos productos alimentarios y agrícolas, de modo que pueda garantizar la seguridad alimentaria en China.

20 Los métodos existentes para la detección de aflatoxina incluyen cromatografía de capa fina, análisis instrumental y análisis inmunológico. La cromatografía de capa fina es un método común para la detección de aflatoxina en una fase temprana, que no requiere instrumentos especiales y se puede llevar a cabo en un laboratorio promedio. Sin embargo, la cromatografía de capa fina requiere una gran dosificación de reactivo y un procedimiento complicado, se ve gravemente interferida por otros componentes y tiene una mala precisión, de este modo, prácticamente no puede cuantificar con exactitud. Además, la cromatografía de capa fina provoca un peligro de contaminación grave a los 25 experimentos y el entorno circundante y, de este modo, no es adecuada por una detección en el sitio. El análisis instrumental incluye principalmente espectrofotometría de fluorescencia y cromatografía líquida de alto rendimiento, que tienen las ventajas de una alta sensibilidad y una precisión preferente. Sin embargo, los métodos anteriormente mencionados requieren un alto grado de purificación de la muestra de aflatoxina. La tecnología de pretratamiento de la muestra tradicional, tal como extracción de líquido-líquido, extracción de fase sólida y microextracción de fase sólida, 30 tiene un procedimiento de pretratamiento complicado y menos especificidad. En este caso, el establecimiento de un pretratamiento de muestra rápido y eficaz se ha vuelto el primer problema y cuello de botella de la detección y el análisis de la aflatoxina. La columna de inmutuafinidad es un nuevo tipo de tecnología de pretratamiento de muestras eficaz, que implementa el enriquecimiento y la purificación de sustancia diana en muestras complejas basándose en la unión reversible de especificidades de antígeno y anticuerpo. La columna de inmutuafinidad combinada con análisis 35 cromatográfico de fase líquida, dispositivo de rápida detección de fluorescencia y método ELISA pueden usarse ampliamente con la detección de aflatoxina en productos agrícolas y alimentos.

Actualmente, la columna de inmutuafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina se prepara principalmente acoplando anticuerpo tradicional (anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal) con micropartículas de gel de sefarosa y gel de sílice. FEI MA ET: "Preparation of an Immunoaffinity Column with Amino-Silica Gel Microparticles and Its Application 40 in Sample Cleanup for Aflatoxin Detection in Agri-Products, *Molecules* 2013, 18(2), 2222-2235" estableció una columna de inmutuafinidad para la extracción selectiva de aflatoxinas en productos agrícolas. Específicamente, la columna de inmutuafinidad se desarrolló acoplando covalentemente anticuerpo 1C11 monoclonal frente a aflatoxinas con respecto a micropartículas de gel de amino-sílice y, a continuación, empaquetando estas en un cartucho

45 Puesto que la actividad del anticuerpo tradicional se degenera rápidamente durante su uso, es un problema técnico que la columna de inmutuafinidad disponible en el mercado solo puede usarse repetidamente durante un número limitado de veces. LIU ET AL: "Research on panning methods of Single-Domain in Heavy-Chain Antibody Fragments for Aflatoxin B1 From Non-Immune Library" vol.30,no 6,Nov,2011, *Journal of Food Science and Biotechnology*" comparaba la eficacia de dos estrategias de eluciones en la bioselección de biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos(HCABs) de cadena pesada de único dominio frente a hapteno molecular, Aflatoxina B1 (AFB1). De acuerdo 50 con la descripción textual y los datos de este artículo, Solo demuestra que reconocer AFB1-BSA o AFB1-OVA pero no puede reconocer BAS u OVA, No puede demostrar que sus clones de fase son capaces de reconocer específicamente AFB1.

Hasta el momento, aún no existe ningún informe relacionado con inmunoabsorbente ni columna de afinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina.

**Sumario de la invención**

La presente divulgación tiene por objeto proporcionar un inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina y una columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina, así como métodos de preparación y uso de los mismos.

5 Para alcanzar realizar el objetivo de la presente divulgación, se adopta la siguiente solución técnica. Se proporciona inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina, caracterizado por que el inmunoabsorbente contiene vehículo de fase sólida y anticuerpo VHH de aflatoxina acoplado con el vehículo de fase sólida, en donde el anticuerpo VHH de aflatoxina es anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15, la secuencia de aminoácidos del mismo como se ilustra en SEQ ID NO:7 secuencia codificante de la misma como se ilustra en SEQ IDNO:8.

10 Según la solución técnica anterior, tres regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 tienen respectivamente secuencias de aminoácidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de CDR1 como se ilustra en SEQ ID NO:1, la secuencia de aminoácidos de CDR2 como se representa en la SEQ ID NO:2 y secuencia de aminoácidos de CDR3 como se ilustra en la SEQ ID NO:3; y las tres regiones determinantes de la complementariedad de las mismas tienen respectivamente secuencias codificantes que comprenden la secuencia codificante de CDR1 como se ilustra en SEQ ID NO:4, secuencia codificante de CDR2 como se representa en la SEQ ID NO:5 y secuencia codificante de CDR3 como se representa en la SEQ ID NO:6.

Según la solución técnica anterior, el vehículo de fase sólida son micropartículas de gel de sefarosa o gel de sílice.

Un método de preparación de dicho inmunoabsorbente de anticuerpo VHH de aflatoxina, caracterizado por que, cuando el vehículo de fase sólida son micropartículas de gel de sílice, el método comprende las etapas de: pesar 1-5 g de micropartículas de gel de sílice y lavar las micropartículas de gel de sílice con agua pura y tampón fosfato de pH 6 alternativamente; suspender las micropartículas de gel de sílice en 5-25 ml de tampón fosfato de pH 6 ya agitar hasta que todas las micropartículas de gel de sílice estén suspendidas, para permitir la suspensión de las micropartículas de gel de sílice; disolver 2-10 mg de anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 en 1-5 ml de tampón fosfato de pH 6 y añadir gota a gota la solución resultante en la suspensión de micropartículas de gel de sílice; pesar 70-350 mg de carbodiimida y añadir rápidamente la carbodiimida en la suspensión de micropartículas de gel de sílice y hacer reaccionar con agitación a 4 °C durante 18-22 h, para proporcionar inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina con micropartículas de gel de sílice como el vehículo de fase sólida; o cuando el vehículo de fase sólida es gel de sefarosa, el método comprende las etapas de: pesar 0,3-1 g de sefarosa y lavar la sefarosa repetidamente con 1 mM de solución HCl; suspender la sefarosa en 5-15 ml de tampón de acoplamiento, añadir 0,6-2 ml de anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 en la misma y hacer reaccionar la solución resultante con agitación durante 1-2 h a temperatura ambiente para proporcionar la suspensión de gel de sefarosa; filtrar la solución de anticuerpo en solución de gel de sefarosa que no está acoplada con el gel de sefarosa y lavar el gel de sefarosa con tampón de acoplamiento; añadir 0,1 M de tampón Tris- HCl de pH 8,0 y hacer reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h; y lavar el gel de sefarosa alternativamente con 0,1 M de tampón Tris-HCl de pH 8,0 y 0,1 M de tampón Tris-HCl de pH 4,0, para proporcionar inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina con gel de sefarosa como el vehículo de fase sólida; siendo el tampón de acoplamiento 0,1 M de NaCO<sub>3</sub> y 0,5 M de NaCl de pH 8,3.

Se proporciona columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina con inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina.

40 Un método de preparación de columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina, que comprende las etapas de: cargar el inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina en un tubo de extracción de fase sólida, añadir 0,01 M de tampón fosfato de pH 6 en la misma y dejar que la solución resultante se precipite de forma natural; lavar con 0,01 M de tampón fosfato de pH 6 almacenar la carga resultante en 0,01 M de tampón fosfato de pH 6 que contiene 0,02 % en peso de azida de sodio, obteniendo, de este modo, columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina.

45 Un método de purificación y concentración de aflatoxina B1 comprendida en una solución de extracción de una muestra que usa la columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina, comprendiendo el método:

50 en primer lugar, aclarar la columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina con agua purificada, a continuación, añadir la solución de extracción de una muestra; aclarar con agua purificada en donde después del drenaje del líquido completamente, eluir con metanol y recoger el eluato, el eluato se purifica y la extracción concentrada de la muestra que puede usarse directamente para cargarla a una máquina para su detección.

La presente divulgación tiene los siguientes efectos beneficiosos.

(1) Una concentración de inhibición del 50 % (CI<sub>50</sub>) de anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 de acuerdo con la presente divulgación frente a aflatoxina B1 es 0,66 ng/ml y reactividad cruzada de la misma frente a aflatoxina B2, G1, G2 y M1 son respectivamente el 22,6 %, 10,95 %, 32,1 % y 26 %. Una capacidad de columna de la columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina preparada de acuerdo con la presente divulgación se encuentra en un intervalo de 500-600 ng y una recuperación estándar de carga de aflatoxina B1 de la misma se encuentra en un intervalo del 80-100 % en peso.

(2) La columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina de acuerdo con la presente divulgación tiene las ventajas de estabilidad deseable, termoestabilidad, resistencia ácida y alcalina y resistencia a reactivo orgánico. La columna de afinidad tiene una larga vida útil, puede usarse repetidamente durante múltiples veces y puede usarse para purificar y concentrar la solución para la extracción de una muestra antes de su detección.

(3) El anticuerpo VHH de aflatoxina de acuerdo con la presente divulgación se obtiene mediante ingeniería genética y tiene las ventajas de bajos costes y fácil preparación. En este caso, la columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina preparada con dicho anticuerpo VHH de aflatoxina es más ventajosa en comparación con una columna de afinidad de anticuerpos VHH convencional.

## 15 Descripción detallada de las realizaciones

### Ejemplo 1: Establecimiento de biblioteca de genes de anticuerpo VHH de aflatoxina y preparación del anticuerpo VHH.

1. Se llevó a cabo inmunización animal.

Se adquirió una alpaca macho de dos años de edad y antígeno para la inmunización a aflatoxina B1 (AFB1-BSA, fabricado por Sigma company). Se emulsionaron 200 µg de antígeno de aflatoxina B1 con adyuvante incompleto de Freund y la alpaca se inyectó con la emulsión resultante subcutáneamente en varios sitios. La alpaca se inmunizó cada tres semanas y se tomaron muestras de sangre de la vena desde el 7<sup>º</sup> día hasta el 10<sup>º</sup> día después de cada inmunización. Se midió un título del suero mediante un método ELISA indirecto. Se seleccionó una inmunización con el título más alto y se tomó una muestra de 10 ml de sangre, de la cual se extrajo ARN total.

2. Se estableció una librería de ADNc.

(1) Se extrajo ARN total. Se seleccionó una inmunización con el título más alto. Se tomó una muestra de 10 ml de sangre de la alpaca del 7<sup>º</sup> día hasta el 10<sup>º</sup> día después de la inmunización, de la cual se extrajo el ARN total. El ARN total en la muestra de sangre de la alpaca se extrajo con un sistema de aislamiento de ARN total de LeukoLOCK fabricado por Life Technology Company.

(2) Se llevó a cabo la síntesis de ADNc. Se llevó a cabo transcripción inversa realizada siguiendo una instrucción de transcriptasa inversa de Promega company, con el ARN total obtenido desde la parte superior (1) como molde y oligo (dT)<sub>15</sub> como cebador, para sintetizar una primera cadena de ADNc y obtener una biblioteca de ADNc.

3. Se estableció una biblioteca de genes de anticuerpos VHH de aflatoxina.

(1) Se llevó a cabo amplificación de PCR para obtener genes de dominio variable de anticuerpos de cadena pesada de la alpaca, es decir, genes VHH, con ADNc sintetizado de acuerdo con la anterior sección 2 como molde y con R1 y F o R2 y F, como cebador. 2 µl de ADNc, 5 µl de tampón de 10XPCR, 2 µl de 50 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1 µl de 10 mmol/l de dNTP, 1 µl de 10 µmol/l de cebador F, 1 µl de 10 µmol/l de cebador R1 (o R2), 0,1 µl de polimerasa de ADN y 37,9 µl de agua pura estéril se mezclaron con formación de vórtice uniformemente, para proporcionar 50 µl de solución mezclada. Después de una breve centrifugación de la solución mezclada resultante, se llevó a cabo reacción por amplificación de PCR en condiciones de reacción que incluyen desnaturalización a 94 °C durante 2 min y posterior desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s, extensión a 68 °C durante 1 min y 30 circulaciones y, a continuación, extensión a 68 °C durante 5 min.

R1 fue 5-CGGCGCACCTGCGGCCGC ATGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG -3' (SEQ ID NO:11), R2 fue 5'-CG-GCGCACCTGCGGCCGC GTCTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG -3' (SEQ ID NO:13) y F fue 5'-TCCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCC CAGKTGCAGCTCGTGGAGTC-3' (SEQ ID NO:12), en la que las partes subrayadas de las secuencias de cebador fueron homólogas con el vector (his) pCANTAB 5E. Se llevaron a cabo 4 veces de reacción de amplificación de PCR, con R1 y F como el cebador y 6 veces de reacción de amplificación de PCR, con R2 y F como el cebador. Se separó producto de PCR resultante mediante 0,7 % electroforesis de gel de agarosa y se purificaron y recuperaron fragmentos de ADN de 450 pb con un kit.

(2) Se construyó vector (his) pCANTAB 5E. Se llevó a cabo amplificación de PCR de fragmentos de ADN desde *Sfi* I a *Not* I sobre plásmido de vector pCANTAB5E, con plásmido de vector pCANTAB5E como molde, p5E *Sfi*-F: 5'-ATGCGGCCAGCCGGCC-3' (*Sfi* I, (SEQ ID NO:9) como cebador corriente arriba y p5E N-P-H-R: 5'-



en posición en un incubador a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, el título de fago en el eluato se determinó mediante recuento del número de colonias sobre las placas. El cultivo bacteriano TG1 infectado restante se transfirió en 6 ml de medio SB, en el que se añadieron 1,5 µl de 100 mg/ml de ampicilina, se agitó a 37 °C durante 1 h y se complementó con ampicilina para alcanzar una concentración final de 50 µg/ml; se agitó adicionalmente durante 1 h, se añadió 1 ml de auxiliar de fago M13KO7 (1 x10<sup>12</sup>pfu/ml), y se mantuvo en posición a 37 °C durante 30 min. El cultivo bacteriano se transfirió, a continuación, en 100 ml de medio SB, se añadieron 46 µl de ampicilina (100 mg/ml), se agitó adicionalmente durante 2 h, complementó con kanamicina para alcanzar una concentración final de 70 µg/ml y se agitó a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo bacteriano a una velocidad de 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió desde aquí y, a continuación se añadió 1/4 de solución de PEG/NaCl, se incubó sobre hielo durante 2 h y se centrifugó a una velocidad de 12.000 rpm durante 20 min a 4 °C. El sedimento se disolvió en 1 % de solución de BSA-PBS para obtener producto amplificado de la primera ronda de selección. El producto amplificado se mantuvo para su uso en la siguiente ronda. En posteriores rondas de selección, las concentraciones de antígeno de recubrimiento de AFB<sub>1</sub>-BSA fueron respectivamente 0,5 µg/pocillo, 0,1 µg/pocillo y 0,05 µg/pocillo y los eluatos fueron respectivamente soluciones de AFB<sub>1</sub> de 500 ng/ml, 100 ng/ml y 50 ng/ml.

#### 5. Identificación de clones positivos

Después de 4 rondas de selección, se diluyeron en serie 2 µl de eluato y se tomaron para infectar cultivo bacteriano de TG1 que se ha cultivado en la fase logarítmica. El cultivo bacteriano de TG1 infectado se colocó sobre placas de LB-ampicilina. Las placas se colocaron boca abajo y se incubaron a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, se recogieron al azar 30 clones y se añadió a cada uno 3 ml de medio de cultivo de SB-ampicilina y se agitaron para cultivarse a 37 °C durante 6-8 horas hasta que la DO<sub>600</sub> fue de aproximadamente 0,6. Se añadió al cultivo bacteriano 30 µl de fago auxiliar M13KO7 (1 x10<sup>12</sup>pfu/ml), se mantuvo en posición a 37 °C durante 30 min y, a continuación se agitó adicionalmente durante 2 h. El cultivo bacteriano se complementó con kanamicina para alcanzar una concentración final de 70 µg/ml y, a continuación se agitó para cultivarse durante la noche. Al día siguiente, el cultivo bacteriano se centrifugó a una velocidad de 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C para obtener el sobrenadante del cultivo bacteriano.

Se preparó solución de AFB<sub>1</sub>-BSA en solución de recubrimiento hasta que una concentración final alcanzó 0,2 µg/ml. La solución de AFB<sub>1</sub>-BSA preparada se tomó para recubrir una placa ELISA de 96 pocillos, con 100 µl en cada pocillo. Mientras tanto, se tomó otra placa ELISA, con 32 pocillos de los mismos antes de recubrirse con un 3 % de BSA, a 4 °C durante una noche. Al día siguiente, se descartó la solución y la placa se lavó con PBST 3 veces y se bloqueó con 3 % de polvo de leche desnatada-PBS durante 1 h. Se tomó solución madre estándar de AFB<sub>1</sub> para preparar soluciones de trabajo respectivamente que tuvieran concentraciones de 100 ng/ml y 0 ng/ml con 10 % de metanol/PBS. Las soluciones de trabajo se añadieron respectivamente en pocillos recubiertos con antígeno de AFB<sub>1</sub>-BSA. Se añadió en cada pocillo 50 µl del sobrenadante anteriormente mencionado del cultivo bacteriano. El ensayo con solución de trabajo de cada concentración se repitió 3 veces. 10 % de metanol/PBS y 50 µl del sobrenadante anteriormente mencionado del cultivo bacteriano se añadieron en cada pocillo recubierto con BSA como control y se mezcló uniformemente agitando suavemente la placa. La placa se colocó a 37 °C en el incubador para reaccionar durante 1 h. La placa se lavó con PBST 10 veces. Posteriormente, en cada pocillo se añadieron 100 µl de HRP/ANTI-M13, que se habían diluido con PBS en una proporción de 1:5000 y la placa se incubó a 37 °C durante 1 h. Le siguieron 6 lavados con PBST. Se añadieron 100 µl en cada pocillo de solución de sustrato de TMB recién preparada y la placa se incubó a 37 °C durante 15 min. Se añadieron 50 µl de 2 mol/l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en cada pocillo para finalizar la reacción; y se midieron respectivamente los valores de DO<sub>450</sub> mediante un lector de microplacas. Los clones de fase positiva fueron aquellos que no adsorbieron BSA, pero adsorbían AFB<sub>1</sub>-BSA y competían con la aflatoxina añadida. Se seleccionaron los pocillos que tenían tanto una adsorbancia como sensibilidad relativamente altas, obteniendo, de este modo, anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 con presentación de fagos.

La especificidad de anticuerpos de anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 medida mediante método ELISA competitivo indirecto se puede describir específicamente en términos de reactividad cruzada. El método es del siguiente modo. Cinco soluciones madre estándar distintas de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, y AFM<sub>1</sub> se diluyeron respectivamente con un 10 % de metanol/PBS en gradiente con respecto a diez concentraciones de trabajo distintas, para determinar la especificidad del anticuerpo mediante método ELISA competitivo indirecto con las mismas condiciones. Se extrajeron sucesivamente las curvas ELISA competitivo de las cinco aflatoxinas y se calcularon las respectivas concentraciones de sustancia estándar de una relación de inhibición del 50 % representada por CI<sub>50</sub>. Se calcularon las reactividades cruzadas basándose en la siguiente fórmula: reactividad cruzada (%) = (AFB<sub>1</sub>CI<sub>50</sub>/ CI<sub>50</sub> análogo) x100 %. En la fórmula, el análogo puede ser AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> o AFM<sub>1</sub>. 50 % de concentración de inhibición de anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 frente a aflatoxina B1 obtenida fue de 0,66 ng/ml y las reactividades cruzadas de las mismas con respecto a aflatoxinas B2, G1, G2 y M1 fueron respectivamente del 22,6 %, 10,95 %, 32,1 % y 26 %. En este caso, el anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 fue un anticuerpo específico frente a aflatoxina B1. Los experimentos de tolerancia mostraron que la resistencia a disolventes orgánicos anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 se mejoró en un 35 % y la resistencia a elevada temperatura de la misma se mejoró en un 46 %, en comparación con anticuerpos de fuente murina convencionales y anticuerpos de fuente de conejo.

El cultivo bacteriano clonado seleccionado que contenía anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 se envió a

Shanghai Sunny Biotechnology Co., Ltd. para su análisis secuencial, con cebador universal R1 para vector de fagos 5'-CCA TGA TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC-3'. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 obtenido como se ilustra en SEQ ID No:7 y una secuencia codificante de la misma como se ilustra en SEQ ID No:8. Tres regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 tuvieron respectivamente secuencias de aminoácidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de CDR1 como se ilustra en SEQ ID NO:1, la secuencia de aminoácidos de CDR2 como se representa en la SEQ ID NO:2 y secuencia de aminoácidos de CDR3 como se ilustra en la SEQ ID NO:3; y las tres regiones determinantes de la complementariedad de las mismas tuvieron respectivamente secuencias codificantes que comprenden la secuencia codificante de CDR1 como se ilustra en SEQ ID NO:4, secuencia codificante de CDR2 como se representa en la SEQ ID NO:5 y secuencia codificante de CDR3 como se representa en la SEQ ID NO:6.

#### 6. Preparación y purificación de anticuerpo VHH de aflatoxina 2014AFB-G15.

- (1) Se obtuvo cultivo bacteriano de TG1 capaz de secretar anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15. Se extrajeron plásmidos con un kit de miniextracción de ADN de Qiagen y se transformó en células competentes de HB2151. Las células competentes transformadas se cultivaron en placas sobre placas de LB-ampicilina.
- (2) Se seleccionaron colonias de HB2151 que contenían plásmidos de anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 y se inocularon en un medio líquido de SB-ampicilina de 100 ml y se cultivaron a una velocidad de 250 rpm a 37 °C hasta que la DO<sub>600</sub> se encontraba en un intervalo de 0,5-0,8. Se añadieron 200 µl de 0,5 M de IPTG en el cultivo para su inducción durante la noche.
- (3) El cultivo resultante después de la inducción se centrifugó a una velocidad de 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se retiró cuidadosamente en un banco de operación estéril y se extrajo proteína soluble de suspensiones de células bacterianas mediante un método de choque osmótico, para obtener sobrenadante que contiene la proteína. El sobrenadante que contenía la proteína se filtró a través de una membrana de filtro de 0,22 µm y se dializó en tampón de equilibrado (que contenía 50 mM de fosfato, 300 mM de cloruro de sodio y 20 mM de imidazol; pH 7,4) al durante la noche.
- (4) Se purificaron los anticuerpos mediante columna de níquel His60 (fabricada por Clontech Technology). En primer lugar, Se aclaró la columna de níquel con 10 volúmenes de tampón de equilibrado. El sobrenadante que contenía la proteína dializada en la anterior etapa (3) se cargó en la columna de níquel His60 (Clontech Technology) para la purificación de anticuerpos. Posteriormente, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de aclarado (que contenía 50 mM de fosfato, 300 mM de cloruro de sodio y 40 mM de imidazol; pH 7,4.). Por último, el anticuerpo 2014AFB-G15 se eluyó 10 volúmenes de columna de tampón de elución (que contenía 50 mM de fosfato, 300 mM de cloruro de sodio y 300 mM de imidazol; pH 7,4.). El eluato resultante se recogió y puso en una bolsa de diálisis, se dializó con 0,01 M de tampón fosfato de pH 7,4 durante de 2 a 3 días y, a continuación se concentró. El eluato concentrado se fraccionó y almacenó a -20 °C para su uso posterior.

#### Ejemplo 2: Preparación de inmunoabsorbente y columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina.

- El inmunoabsorbente de acuerdo con el presente ejemplo contenía vehículo de fase sólida (micropartículas de gel de sílice) y anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 acoplado con el vehículo de fase sólida. El inmunoabsorbente se preparó específicamente de acuerdo con el siguiente método. Se pesó 1 g de micropartículas de gel de sílice de acrilamida y se pusieron en un matraz cónico y se lavaron alternativamente con agua pura y tampón fosfato de pH 6. Se midieron 5 ml de tampón fosfato de pH 6 para suspender las micropartículas y se obtuvo la suspensión de micropartículas. La suspensión de micropartículas se transfirió en una cubeta de agitación y se agitó con un agitador hasta que todas las micropartículas se suspendieron. Se disolvieron 2 mg de anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 en 1 ml de tampón fosfato de pH 6 y se añadieron gota a gota en la suspensión de micropartículas anteriormente obtenida. Se pesaron 70 mg de EDC y se añadieron rápidamente en la cubeta de agitación y se agitó a 4 °C durante 18-22 h, para proporcionar inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina.
- La columna de inmunoafinidad de anticuerpos de VHH de aflatoxina se preparó de acuerdo con el siguiente método. Se cargaron 0,2 ml del inmunoabsorbente anteriormente obtenido en un tubo de extracción de fase sólida. Se añadieron 0,01 M de tampón fosfato de pH 6 en el tubo de extracción de fase sólida para su precipitación natural. El precipitado resultante se lavó con 0,01 M de tampón fosfato de pH 6, y a continuación se mantuvo en 0,01 M de tampón fosfato de pH 6 que contiene 0,02 % en peso de azida de sodio, para proporcionar una columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina. La columna de inmunoafinidad de anticuerpos de VHH de aflatoxina se mantuvo a 4 °C como reserva.

#### Ejemplo 3: Preparación de inmunoabsorbente y columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina.

El inmunoabsorbente de acuerdo con el presente ejemplo contenía vehículo de fase sólida (sefarosa) y anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 acoplado con el vehículo de fase sólida. El inmunoabsorbente se preparó

específicamente de acuerdo con el siguiente método. se tomaron 0,3 g de sefarosa y se pusieron en un matraz cónico y se lavaron repetidamente con 1 mM de solución HCl durante sobre 15 min. La sefarosa se suspendió en 5 ml de tampón de acoplamiento (0,1 M de NaCO<sub>3</sub> y 0,5 M de NaCl; pH 8,3). Se añadieron 0,6 mg de anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 en la mezcla que contenía sefarosa y se agitaron a una velocidad de 150 rpm a temperatura ambiente durante 1 h, para proporcionar la suspensión de gel de sefarosa. La suspensión de gel de sefarosa se transfirió en embudos de núcleo de arena, de modo que la solución que contenía el anticuerpo que no se había acoplado pudiera fluir fuera. El gel de sefarosa se lavó con tampón de acoplamiento de 5 veces el volumen del gel de sefarosa. Después, se añadió tampón de bloque (0,1 M de Tris-HCl de pH 8,0) de 2 veces el volumen del gel de sefarosa para su reacción a temperatura ambiente durante 2h. Posteriormente, el gel de sefarosa se lavó alternativamente con tampón de alto pH (0,1 M de Tris-HCl de pH 8,0) y tapón de bajo pH (0,1 M de Tris-HCl de pH 4,0) tres veces y se obtuvo inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina.

La columna de inmunoafinidad de anticuerpos de VHH de aflatoxina se preparó de acuerdo con el siguiente método. Se cargaron 0,2 ml del inmunoabsorbente anteriormente obtenido en un tubo de extracción de fase sólida. Se añadieron 0,01 M de tampón fosfato de pH 6 en el tubo de extracción de fase sólida para su precipitación natural. El precipitado resultante se lavó con 0,01 M de tampón fosfato de pH 6, y a continuación se mantuvo en 0,01 M de tampón fosfato de pH 6 que contiene 0,02 % en peso de azida de sodio, para proporcionar una columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina. La columna de inmunoafinidad de anticuerpos de VHH de aflatoxina se mantuvo a 4 °C como reserva.

#### **Ejemplo 4: Medición de capacidad de columna de la columna de inmunoafinidad de anticuerpo de VHH de aflatoxina.**

La columna de inmunoafinidad preparada de acuerdo con el ejemplo 2 o ejemplo 3 se lavó con 10 ml de agua pura. Solución estándar de aflatoxina B1 (que tenía una concentración de 100 ng/ml y un contenido total de aflatoxina B1 de 1 mg) disuelta en 10 ml de 10 % de metanol/PBS se pasó a través de la columna. La columna se lavó con 10 ml de agua pura, de modo que puede retirarse la aflatoxina no unida. Por último, la columna se eluyó con 5 ml de solución de metanol. Se recogió el eluato resultante y se fraccionó con tubos, con 1 ml en cada tubo. El contenido de aflatoxina en el eluato se midió mediante método de cromatografía líquida. Los resultados indicaron que una capacidad de columna de la columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina se encuentra en un intervalo de 500-600 ng. Después, la columna de inmunoafinidad se usó repetidamente cinco veces, la capacidad de columna de la misma aún podía alcanzar 480 ng. En este caso, la columna de inmunoafinidad puede usarse repetidamente. Mientras tanto, como se muestra mediante los resultados de la medición de reactividad cruzada, la columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina de acuerdo con la presente divulgación puede unirse específicamente a aflatoxina B1, B2, G1, G2 y M1 simultáneamente, pero no se uniría a otra fungitoxina, tal como zearalenona, vomitoxina, ochratoxina.

#### **Ejemplo 5: Medición de recuperación estándar de carga de la columna de inmunoafinidad de anticuerpo de VHH de aflatoxina.**

Para cada uno de cacahuetes, maíz, aceite vegetal y forraje, se prepararon tres muestras en blanco que no contenían aflatoxina, cada uno pesaba 5 g. En cada una de las tres muestras en blanco se añadieron respectivamente 50 ng, 250 ng y 500 ng de sustancia estándar de aflatoxina B1. Se realizó extracción ultrasónica convencional a 50 °C durante 10 min usando 15 ml de 70 % de metanol-agua (que contenía 4 % de NaCl). La solución de extracción se filtró a través de un papel de filtro. Se añadieron 2 ml de éter de petróleo en 4 ml del filtrado. La mezcla se agitó con formación de vórtice y se posicionó para su estratificación. Se tomaron 3 ml de una capa inferior y se añadieron con 8 ml de agua pura, y la mezcla resultante se filtró a través de una membrana orgánica de 0,45 µm para proporcionar filtrado, es decir, solución de extracción de muestra. La columna de inmunoafinidad preparada de acuerdo con el ejemplo 2 o ejemplo 3 se lavó con 10 ml de agua pura, se cargó con 8 ml de dicha solución de extracción de muestra y, a continuación, se eluyó con 10 ml de agua pura. Después de drenar el fluido, la columna de inmunoafinidad se eluyó con 1 ml de metanol. Se recogió el eluato y se cargó en una cromatografía líquida de alto rendimiento, de modo que se puede detectar el contenido de aflatoxina en el eluato. Posteriormente, se calculó la recuperación. Los resultados indicaron que una tasa de recuperación promedio de la columna de inmunoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina B1 se encuentra en un intervalo del 80-100 % en peso.

#### **Lista de secuencias**

<110> Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agriculture Science

<120> INMUNOABSORBENTE Y COLUMNA DE INMUNOAFINIDAD DE NANOCUERPOS DE AFLATOXINA Y MÉTODO DE PREPARACIÓN Y USO DEL MISMO

<160> 8

<210> 1

ES 2 718 624 T3

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Vicugna vicugna

<400> 1

5 Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
 1 5

<210> 2  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Vicugna vicugna

10 <400> 2

Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 3  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Vicugna vicugna

15

<400> 3

Ala Ala Gly Phe Ser Gly Asn Tyr Tyr Arg Thr Pro Asp Tyr  
 1 5 10 14

<210> 4  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Vicugna vicugna

20

<400> 4  
 ggacgcacct tcagtagcta cgcc 24

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Vicugna vicugna

25

<400> 5  
 attagctgga gtggtgtag c 21

<210> 6  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Vicugna vicugna

30

<400> 6  
 gcagctggct ttagtgtaa ttactaccgc acaccggact ac 42

35

<210> 7  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Vicugna vicugna

40 <400> 7

ES 2 718 624 T3

Gln	Leu	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser
				20					25					30
Ser	Tyr	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg
				35					40					45
Glu	Phe	Val	Ala	Ala	Ile	Ser	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr
				50					55					60
Thr	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Asn	Arg	Asp	Asn	Ala
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Asn	Tyr	Tyr
				95					100					105
Arg	Thr	Pro	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser
				110					115					120
Ser	Glu	Pro	Lys	Thr	Pro	Lys	Pro	Gln	Asp					
				125					130					

<210> 8  
 <211> 390  
 <212> ADN  
 <213> Vicugna vicugna

5

<400> 8

cagttgcagc	tcgtggagtc	tgggggagga	ttggtgcagg	ctgggggctc	tctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggacg	caccttcagt	agctacgcca	tgggctgggt	ccgccaggct	120
ccagggaagg	agcgtgagtt	tgtagcggct	attagctgga	gtggtggttag	cacatactat	180
acagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	aacagagaca	acgccaagaa	cacggtgtat	240
ctgcaaataa	acagcctgaa	acctgaggac	acggccggtt	attactgtgc	agctggcttt	300
agtggtaatt	actaccgcac	acccgactac	tggggccagg	ggaccagggt	caccgtctcc	360
tcagaaccca	agacacccaa	accacaagac				390

## REIVINDICACIONES

1. Inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina, **caracterizado por que** el inmunoabsorbente contiene vehículo de fase sólida y anticuerpo VHH de aflatoxina acoplado con el vehículo de fase sólida, en donde el anticuerpo VHH de aflatoxina es anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15, siendo la secuencia de aminoácidos del mismo como se representa en la SEQ ID NO:7 y siendo la secuencia de aminoácidos del mismo como se ilustra en la SEQ ID NO:8.
2. El inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** tres regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 tienen respectivamente secuencias de aminoácidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de CDR1 como se ilustra en SEQ ID NO:1, la secuencia de aminoácidos de CDR2 como se representa en la SEQ ID NO:2 y secuencia de aminoácidos de CDR3 como se ilustra en la SEQ ID NO:3; y las tres regiones determinantes de la complementariedad de las mismas tienen respectivamente secuencias codificantes que comprenden la secuencia codificante de CDR1 como se ilustra en SEQ ID NO:4, secuencia codificante de CDR2 como se representa en la SEQ ID NO:5 y secuencia codificante de CDR3 como se representa en la SEQ ID NO:6.
3. El inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el vehículo de fase sólida son micropartículas de gel de sefarosa o gel de sílice.
4. Un método de preparación de inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que**, cuando el vehículo de fase sólida son micropartículas de gel de sílice, el método comprende las etapas de: pesar 1-5 g de micropartículas de gel de sílice y lavar las micropartículas de gel de sílice con agua pura y tampón fosfato de pH 6 alternativamente; suspender las micropartículas de gel de sílice en 5-25 ml de tampón fosfato de pH 6 y agitar hasta que todas las micropartículas de gel de sílice estén suspendidas, para permitir la suspensión de las micropartículas de gel de sílice; disolver 2-10 mg de anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 en 1-5 ml de tampón fosfato de pH 6 y añadir gota a gota la solución resultante en la suspensión de micropartículas de gel de sílice; pesar 70-350 mg de carbodiimida y añadir rápidamente la carbodiimida en la suspensión de micropartículas de gel de sílice y hacer reaccionar con agitación a 4 °C durante 18-22 h, para proporcionar inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina con micropartículas de gel de sílice como el vehículo de fase sólida; o cuando el vehículo de fase sólida es gel de sefarosa, el método comprende las etapas de: pesar 0,3-1 g de sefarosa y lavar la sefarosa repetidamente con 1 mM de solución HCl; suspender la sefarosa en 5-15 ml de tampón de acoplamiento, añadir 0,6-2 ml de anticuerpo VHH de aflatoxina B1 2014AFB-G15 en la misma y hacer reaccionar la solución resultante con agitación durante 1-2 h a temperatura ambiente para proporcionar la suspensión de gel de sefarosa; filtrar la solución de anticuerpo en solución de gel de sefarosa que no está acoplada con el gel de sefarosa y lavar el gel de sefarosa con tampón de acoplamiento; añadir 0,1 M de tampón Tris- HCl de pH 8,0 y hacer reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h; y lavar el gel de sefarosa alternativamente con 0,1 M de tampón Tris-HCl de pH 8,0 y 0,1 M de tampón Tris-HCl de pH 4,0, para proporcionar inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina con gel de sefarosa como el vehículo de fase sólida; siendo el tampón de acoplamiento 0,1 M de NaCO<sub>3</sub> y 0,5 M de NaCl de pH 8,3.
5. Columna de inmuoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina con inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina de acuerdo con la reivindicación 1.
6. Un método de preparación de columna de inmuoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina de la reivindicación 5, que comprende las etapas de: cargar el inmunoabsorbente de anticuerpos VHH de aflatoxina en un tubo de extracción de fase sólida, añadir 0,01 M de tampón fosfato de pH 6 en la misma y dejar que la solución resultante se precipite de forma natural; lavar con 0,01 M de tampón fosfato de pH 6 almacenar la carga resultante en 0,01 M de tampón fosfato de pH 6 que contiene 0,02 % en peso de azida de sodio, obteniendo, de este modo, columna de inmuoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina.
7. Un método de purificación y concentración de aflatoxina B1 comprendida en una solución de extracción de una muestra que usa la columna de inmuoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina de acuerdo con la reivindicación 4, comprendiendo el método:
- en primer lugar, aclarar la columna de inmuoafinidad de anticuerpos VHH de aflatoxina con agua purificada, a continuación, añadir la solución de extracción de una muestra; aclarar con agua purificada en donde después del drenaje del líquido completamente, eluir con metanol y recoger el eluato, el eluato se purifica y la extracción concentrada de la muestra que puede usarse directamente para cargarla a una máquina para su detección.