

Informe final publicable de proyecto

Estandarización del diagnóstico in vitro de alergia contra antibióticos lactámicos usando anticuerpos monodominio

Código de proyecto ANII: FMV_1_2019_1_156321

13/05/2023

GONZALEZ SAPIENZA, Gualberto (Responsable Técnico - Científico)

LASSABE HARGUINDEGUY, Gabriel (Co-Responsable Técnico-Científico)

PÍREZ SCHIRMER, Vania Macarena (Investigador)

SEGOVIA DE LOS SANTOS, Paula (Investigador)

DELFIN RIELA, Triana (Investigador)

DUARTE GARETA, Diego (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

En este proyecto se exploró el uso nanobodies como reactivos estandarizados que pueden sustituir a los estándares biológicos utilizados en muchos métodos diagnósticos. Comúnmente, los inmunoensayos serológicos y los kits de diagnóstico incluyen sueros de estandarizados obtenidos de pacientes (calibradores) que contienen cierta cantidad de anticuerpo que se quiere medir, y que se utilizan como referencia para la cuantificación de estos anticuerpos en los pacientes bajo estudio. Sin embargo, en algunos casos, como el diagnóstico de alergias o enfermedades autoinmunes, suele ser difícil disponer de cantidades suficientes de estos patrones de referencia, y también existen limitaciones en su reproducibilidad lote a lote y estandarización a lo largo del tiempo. Para superar esta dificultad, este trabajo exploró el uso de calibradores recombinantes sustitutos formulados sobre la base de dos anticuerpos de dominio único (nanobodies (Nbs)) combinados a través de un conector peptídico corto para producir una construcción biespecífica (Nb1-Nb2) recombinante. Esta construcción Nb1-Nb2 se comporta en forma similar al anticuerpo a determinar, dado que uno de los Nbs se une al antígeno blanco y el segundo es específico para el paratope del anticuerpo de detección secundario. Por su naturaleza, el Nb biespecífico hereda las propiedades excepcionales de estabilidad y producción a bajo costo por fermentación bacteriana de los nanobodies originales y, una vez calibrado contra el estándar de referencia biológico, puede reproducirse indefinidamente a partir de su secuencia de una manera altamente estandarizada. Como prueba de concepto, generamos y caracterizamos calibradores biespecíficos basados en nanobodies con potencial aplicación en el diagnóstico de alergia contra los antibióticos lactámicos aztreonam, amoxicilina, penicilina,

Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas / Serología de alergias

Palabras clave: nanobody / IgE / lactámicos /

Introducción

La alergia a los beta-lactámicos tiene dos caras. Por un lado la administración de b-lactámicos a pacientes alérgicos puede dar lugar a reacciones de hipersensibilidad que amenacen su vida, y por otro lado la clasificación de un paciente como "alérgico a la penicilina" influye sobre las opciones de antibióticos que un paciente puede recibir, ya sea i) forzando el uso de antibióticos menos eficientes y más costosos lo que dificulta el combate de la infección y promueve la selección de microorganismo multi-resistentes (ej. vancomicina, en lugar de los b-lactámicos nafcilina o cefazolina para *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente), o ii) el uso de antimicrobianos alternativos de amplio espectro que además de promover resistencia tiene generalmente mayor toxicidad (ej. vancomicina, metronidazol y aztreonam en lugar de un beta-lactámico en sepsis).

La forma de lidiar con este problema es diagnosticar si el paciente tiene IgE contra los epítopes del antibiótico a administrar, pero este diagnóstico está limitado por no contar con sueros estandarizados que puedan usarse como referencia. Justamente, el tratar de contribuir a cambiar esta situación fue uno de los objetivos principales de este estudio.

Para esto se trabajó en colaboración con un grupo de la Universidad de Valencia, España que sintetizó haptenos que permitieron cubrir varios antibióticos como amoxicilina, penicilina G, aztreonam, meropenem y la cefalosporina ceftriaxona, y cuyo valor diagnóstico había sido bien establecido utilizando paneles de sueros previamente caracterizados por historia clínica, test en piel (prick test), activación de basófilos, y PHADIA. Estos haptenos conjugados a proteínas como la seroalbumina humana (HSA) se usan como antígenos en los inmunoensayos para alergia, y la detección de las IgEs del paciente se realiza con la ayuda del anticuerpo anti-IgE omalizumab. Sobre la base de estos ensayos se generaron los Nbs biespecíficos que pudieran funcionar como calibradores para los mismos. Para contribuir adicionalmente al diagnóstico de alergias se procedió a la generación de Nbs contra la IgE humana.

Metodología/diseño del estudio

La etapa inicial fue la inmunización de llamas con los haptenos conjugados a la albumina humana, con el omalizumab y con IgE humana. Una vez verificados los altos títulos de anticuerpos contra los haptenos y los anticuerpos se procedió a generar una biblioteca de Nbs expresados en fagos utilizando la tecnología generada en el grupo. A partir de esta biblioteca se seleccionaron nanobodies contra los haptenos. La especificidad contra los mismos se verificó testeando la

ausencia de reactividad contra la proteína carrier utilizada en la inmunización y verificando que los respectivos antibióticos libres eran capaces de inhibir la unión de los nanobodies a los haptenos correspondientes. Similarmente se aislaron Nbs contra el paratope de omalizumab, verificando que la reactividad de los Nbs contra el omalizumab fuese inhibida por el omalizumab libre pero no por IgG1 humanas (que es el isotipo del omalizumab). Con estos Nbs, se construyeron quimeras Nb1-Nb2, donde el Nb1 era alguno de los Nbs contra los haptenos y el Nb2 reconocía el paratope del omalizumab. La funcionalidad de estos nanobodies fue demostrada utilizando sueros de pacientes con alergias confirmadas contra estos antibióticos en comparación con el sistema PHAIA, que es el método comercial de referencia. También se obtuvieron Nbs contra la IgE humana con afinidad sub-nanomolar, y se identificaron pares que reaccionan simultáneamente con la IgE humana constituyendo la base para el desarrollo de un test de detección de IgE.

Resultados, análisis y discusión

Para la generación de la biblioteca, se partió de 10^8 células mononucleares aisladas de la sangre periférica de la llama y se obtuvo una biblioteca con una diversidad de 10^8 clones. La biblioteca se sometió a dos rondas de selección (panning) contra omalizumab, y se seleccionaron los clones que mostraron reactividad contra el paratope de omalizumab, carentes de reactividad contra IgG1 no relacionada, y cuya unión fuese inhibida por la presencia de IgE. En otros experimentos de panning se aislaron nanobodies contra los distintos haptenos realizando dos rondas de panning contra el hapteno conjugado a una proteína distinta a la de inmunización. En este caso se seleccionaron los clones que eran reactivos contra el hapteno, pero no con la proteína carrier, y que además eran inhibidos por el antibiótico en solución. Con estos nanobodies se desarrollaron tres calibradores sintéticos combinando un nanobody anti-paratope de omalizumab con nanobodies anti-aztreonam, anti-amoxicilina, y anti-penicilina para utilizarse en la estandarización del diagnóstico de alergia a antibióticos β -lactámicos de gran importancia. Estos nanobodies en tándem se produjeron en *E. coli* con altos rendimientos, del orden de varios miligramos a decenas de miligramos por litro de cultivo, y se purificaron en columnas de Ni-NTA mediada por una cola peptídica C-terminal de 6xHis. Se verificó que la reactividad de los nanobodies biespecíficos no hubiese sido afectada por su expresión en tándem probándola contra el omalizumab y los haptenos como se explicó anteriormente. Su funcionalidad se confirmó también midiendo la afinidad mediante interferometría de biocapa. Luego, se verificó que los Nbs biespecíficos eran capaces de formar un sandwich cuando se los unían en placas de ELISA a hapteno inmovilizado y al omalizumab en solución, simulando así su uso como calibrador. La potencialidad para su uso como estándares incluyó estudios de estabilidad acelerada manteniéndolos a 37°C durante hasta dos semanas si que se constatará pérdida de actividad.

Conclusiones y recomendaciones

El resultado alcanzado demostró que con Nbs biespecíficos pueden sustituirse estándares biológicos que son limitados, inestables o difíciles de estandarizar y reproducir. Como se comenta en antecedentes, este es un punto crítico porque muchas veces opera como un escollo para que se puedan estandarizar algunos métodos diagnósticos que en muchos casos tiene un gran impacto, como lo es el pobre manejo del uso de antibióticos ante el inexacto etiquetado del potencial alérgico de un paciente a β -lactámicos. En término de formación de RRHH, se está en estado avanzado en el trabajo de tesis de Maestría de Paula Segovia a defender en el correr de 2023.

La prueba de concepto desarrollada no se limita al ejemplo de los antibióticos utilizados en este proyecto, sino que es de aplicación general para otros ensayos serológicos y el inmunodiagnóstico en general. Confirmando lo anterior, como derivación del proyecto se ha concretado un convenio Udelar-Empresa con una compañía europea interesada en esta tecnología. Por otro lado, seguimos trabajando con los Nbs anti-IgE seleccionados que confiamos permitirán avanzar en el desarrollo de capacidad local para el diagnóstico de alergias.

Referencias bibliográficas

-Quintero-Campos P, Segovia-de Los Santos P, Ibáñez-Echevarria E, Hernández-Fernández de Rojas D, Casino P, Lassabe G, González-Sapienza G, Maquieira Á, Morais S. (2022) An ultra-sensitive homologous chemiluminescence immunoassay to tackle penicillin allergy. *Anal Chim Acta*. 1214:339940. doi: 10.1016/j.aca.2022.339940.

-Segovia-de Los Santos P, Quintero-Campos P, Morais S, Echaides C, Maquieira Á, Lassabe G, *Gonzalez-Sapienza G. (2022) Bispecific Single-Domain Antibodies as Highly Standardized Synthetic Calibrators for Immunodiagnosis. *Anal Chem*, 94(2):1342-1349. doi: 10.1021/acs.analchem.1c04603

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)