



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**  
**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I**  
**DEL MEDI NATURAL**  
**Trabajo final de grado**

---

**Síntesis, purificación y caracterización de haptenos de  
amoxicilina. Aplicación al diagnóstico de alergias a  
antibióticos  $\beta$ -lactámicos**

---

**Grado en Biotecnología**  
**Curso académico 2018-2019**  
**València, septiembre 2019**

**Autor:** Sergi Colomer Castell

**Tutor:** Sergi Morais Ezquerro

**Directora experimental:** Edurne Peña Mendizábal



# **Síntesis, purificación y caracterización de haptenos de amoxicilina. Aplicación al diagnóstico de alergias a antibióticos $\beta$ -lactámicos**

**València, septiembre 2019**

## **RESUMEN**

Los  $\beta$ -lactámicos son la familia de antibióticos más consumida a día de hoy, generando la mayoría de alergias a medicamentos con una prevalencia de entre el 5 y el 10%, siendo la amoxicilina el principal inductor. Además, los determinantes antigénicos más utilizados para el diagnóstico *in vitro* de la alergia no garantizan una sensibilidad y especificidad suficientes.

Por ello, en este trabajo se han estudiado nuevas rutas de síntesis de haptenos de amoxicilina y la preparación, purificación y caracterización de determinantes antigénicos. A través de su conjugación con proteínas, se ha realizado su evaluación para el diagnóstico de alergias a antibióticos  $\beta$ -lactámicos mediante inmunoensayos con detección óptica.

**Palabras clave:** amoxicilina; alergia; determinante antigénico; rIgG; inmunoensayo.

# **Síntesi, purificació y caracterizació d'haptens d'amoxicil·lina. Aplicació al diagnòstic d'alèrgies a antibiòtics $\beta$ -lactàmics**

**València, setembre 2019**

## **RESUM**

Els  $\beta$ -lactàmics són la família d'antibiòtics més consumida a dia d'avui, generant la majoria d'alèrgies a medicaments amb una prevalença d'entre el 5 i el 10%, sent l'amoxicil·lina el principal inductor. A més, els determinants antigènics més utilitzats per al diagnòstic *in vitro* de l'alèrgia no garantitzen una sensibilitat i especificitat suficients.

Per això, en aquest treball s'han estudiat noves rutes de síntesi d'haptens d'amoxicil·lina així com la preparació, purificació i caracterització de determinants antigènics. A través de la seua conjugació amb proteïnes, s'ha realitzat la seua avaluació per al diagnòstic d'alèrgies a antibiòtics  $\beta$ -lactàmics mitjançant immunoassaigs amb detecció òptica.

**Paraules clau:** amoxicil·lina; alèrgia; determinant antigènic; rIgG; immunoassaig.

**Synthesis, purification and characterisation of haptens for amoxicillin. Application to the diagnosis of allergies to  $\beta$ -lactam antibiotics**

**València, September 2019**

**ABSTRACT**

Nowadays,  $\beta$ -lactams are the most consumed antibiotics, generating most of drug allergies with a prevalence between 5 and 10%, being amoxicillin the principal inductor. In addition, the most used antigenic determinants for *in vitro* diagnosis do not assure enough clinical sensitivity and specificity.

For this reason, in this work the synthesis of amoxicillin haptens has been approached, together with the preparation, purification and characterisation of antigenic determinants. Its evaluation for  $\beta$ -lactam allergy diagnostics has been carried out with optical based immunoassays.

**Keywords:** amoxicillin; allergy; antigenic determinant; rIgG; immunoassay.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera en primer lugar agradecer a mi familia el haber estado siempre apoyándome durante estos cuatro años de carrera, sin vosotros estoy seguro de que este camino habría sido mucho más difícil.

Agradecer a Edurne el tiempo dedicado, que ha sido muy valioso para mí a pesar de las circunstancias. Gracias a ti he aprendido muchas cosas en un campo que me era prácticamente ajeno, el cual he conseguido llegar a disfrutar.

Gracias a Sergi por todos los consejos, correcciones y la tranquilidad y confianza que me has transmitido en estos últimos meses de carrera.

Gracias a todos los miembros del laboratorio. El ambiente creado no podía ser mejor, me he sentido como en casa.

Finalmente, gracias a mis amigos por todos los grandes momentos que me llevo de esta experiencia que es la universidad, y en especial a Mauro y a Cris, compañeros de tardes en el laboratorio.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Panorama de los antibióticos en la actualidad: problemas derivados de su uso.</b> ..	1
<b>1.2 Antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos.</b> .....	2
<b>1.3 Inmunología de los beta-lactámicos.</b> .....	3
<b>1.3.1 Tipos de hipersensibilidad.</b> .....	3
<b>1.4 Diagnóstico de alergia a antibióticos.</b> .....	4
<b>1.4.1 Pruebas <i>in vivo</i>.</b> .....	4
<b>1.4.2 Pruebas <i>ex vivo</i>.</b> .....	5
<b>1.4.3 Pruebas <i>in vitro</i>.</b> .....	5
<b>1.4 Determinantes antigénicos.</b> .....	6
<b>1.5 Amoxicilina.</b> .....	7
<b>2. OBJETIVO</b> .....	9
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	10
<b>3.1 Reactivos, tampones y disolventes.</b> .....	10
<b>3.2 Purificación de la amoxicilina.</b> .....	11
<b>3.3 Síntesis y purificación de conjugados de amoxicilina-glutaraldehído-HSA.</b> .....	11
<b>3.4 Síntesis de conjugados de amoxicilina biotinilada.</b> .....	12
<b>3.5 Protocolo de evaluación de conjugados.</b> .....	14
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	16
<b>4.1 Evaluación de la purificación de la amoxicilina.</b> .....	16
<b>4.2 Obtención de conjugados mediante reacción con glutaraldehído.</b> .....	16
<b>4.3 Síntesis del hapteno biotina-amoxicilina conjugado amoxicilina-estreptavidina.</b> ..	24
<b>4.4 Ensayo con suero de paciente.</b> .....	28
<b>5 CONCLUSIONES</b> .....	30
<b>6 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cronograma del descubrimiento de los antibióticos. Adaptación de (Gumustas et al., 2017). .....	1
<b>Figura 2.</b> Estructura química de las familias de antibióticos $\beta$ -lactámicos. ....	2
<b>Figura 3.</b> Formación del determinante mayor de (A) penicilinas y (B) cefalosporinas siguiendo el método de Bondaruk y Schneider (1995). ....	7
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la amoxicilina. ....	8
<b>Figura 5.</b> Estructura química del determinante mayor y algunos determinantes menores de la amoxicilina. ....	8
<b>Figura 6.</b> Esquema general del proceso de obtención de conjugados de amoxicilina mediante la vía del glutaraldehído. ....	12
<b>Figura 7.</b> Imagen del equipo de lectura multipocillo para el ensayo de Bradford. En la figura se muestra los resultados de la recta de calibrado (cuadrado rojo) y de dos conjugados (naranja y verde). ....	12
<b>Figura 8.</b> (A) Esquema del sistema montado para la síntesis de amoxicilina biotinilada. [1] Matraz de reacción; [2] Boca vertical; [3] Boca lateral; [4] Línea Schlenk; [5] Trampa de seguridad. (B) Sistema de rotaevaporación. ....	13
<b>Figura 9.</b> Inmunoensayo realizado para evaluar el reconocimiento de los conjugados por rIgGs de conejos inmunizados. ....	14
<b>Figura 10.</b> Esquema del inmunoensayo para la detección de IgE específicas. ....	15
<b>Figura 11.</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de la amoxicilina tras la purificación. La imagen ampliada corresponde a la región de 3,1 ppm a 3,9 ppm de la amoxicilina comercial. .	16
<b>Figura 12.</b> Estructura del glutaraldehído monomérico. ....	17
<b>Figura 13.</b> Reacción química entre el glutaraldehído y el grupo $\epsilon$ -amino terminal del aminoácido lisina de una proteína. El cuadro naranja muestra la base de Schiff formada. ....	17
<b>Figura 14.</b> Proceso de haptización de la amoxicilina a una proteína utilizando glutaraldehído como entrecruzador. ....	18
<b>Figura 15.</b> Diagrama de barras de la intensidad de señal obtenida en el inmunoensayo con los determinantes antigénicos de HSA y P2. ....	19
<b>Figura 16.</b> Intensidad de señal obtenida para los conjugados C9 a C14 en el inmunoensayo con las cuatro rIgGs. ....	21
<b>Figura 17.</b> Espectro de $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) producto de la reacción de amoxicilina-glutaraldehído con relación molar 1:1 en PB 10 mM. ....	23
<b>Figura 18.</b> TLC realizada con el producto obtenido a partir de la relación molar 1:1 en PB durante 3 horas. Revelado de la izquierda izquierda por UV y derecha con $\text{KMnO}_4$ . ....	24
<b>Figura 19.</b> Esquema de la reacción del NHS éster con un compuesto aminado. ....	24
<b>Figura 20.</b> Espectro de $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) del compuesto de reacción obtenido tras la biotinilación de la amoxicilina. ....	25

<b>Figura 21.</b> A la izquierda se muestra la TLC revelada con $\text{KMnO}_4$ y a la derecha su esquema. De izquierda a derecha AMX ( $R_f=0,3$ ), producto ( $R_{f1}=0,3$ ; $R_{f2}=0,6$ ), biotina-NHS-Éster ( $R_f=0,78$ ) y trietilamina (sin punto). .....	26
<b>Figura 22.</b> Montaje de la columna de gel de sílice. (Derecha) TLC obtenida a partir de los tubos 1-36. Tubos 11-12-13-14-15 $R_f=0,63$ . Tubos 17-18-19-20-21 $R_f=0,24$ como media. ....	26
<b>Figura 23.</b> Intensidad de señal obtenida para los conjugados de amoxicilina-biotina-estreptavidina. Dilución de rIgG 1/500. ....	28
<b>Figura 24.</b> Intensidad de señal obtenida para la muestra analizada.....	29



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Conjugados generados para la evaluación del pH de conjugación (C1-C8). .....	18
<b>Tabla 2.</b> Conjugados generados para la evaluación de la relación molar y porcentaje de glutaraldehído (C9-C18). .....	20

## **ABREVIATURAS**

AMX: Amoxicilina

GAM-HRP: IgG de cabra anti-IgG de ratón marcado con la enzima peroxidasa de rábano.

GAR-HRP: IgG de cabra anti-IgG de conejo marcado con la enzima peroxidasa de rábano.

HRP: Peroxidasa de rábano

HSA: Albúmina de suero humano

NHS: N-hidroxisuccinimida

PBS: tampón fosfato salino

PBST: tampón fosfato salino con 0,05% de Tween-20.

rIgG: IgG de conejo

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina

# 1. INTRODUCCIÓN

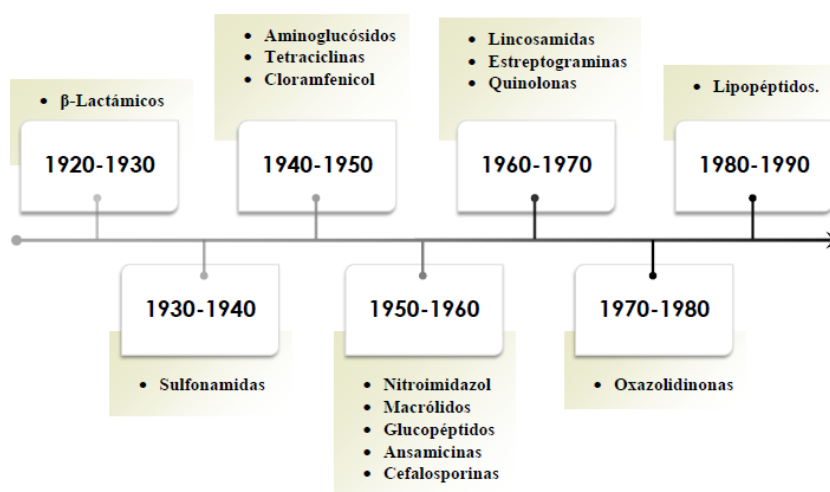
## 1.1 Panorama de los antibióticos en la actualidad: problemas derivados de su uso.

Los antibióticos son sustancias químicas utilizadas para impedir el crecimiento y desarrollo de microorganismos sensibles a ellos. Por ello, son utilizados principalmente para prevenir y tratar infecciones bacterianas.

El consumo y uso de antibióticos por comunidades humanas se remonta a varios siglos atrás. Por ejemplo, se han descubierto trazas de tetraciclina en restos óseos que datan del 350-550 a.C. (Bassett *et al.*, 2010). Sin embargo, su descubrimiento, optimización y aplicación a lo largo de siglo XX es considerado una de las grandes revoluciones en la medicina contemporánea, logrando salvar millones de vidas (Alharbi *et al.*, 2014).

Los tres primeros antibióticos descubiertos fueron el Salvarsán, Prontosil y la penicilina, en la primera mitad del siglo XX. Estos sentaron las bases que entre 1950 y 1970 permitieron lo que se conoce como la era dorada de los antibióticos, descubriéndose casi la totalidad de las clases conocidas hasta ahora (Figura 1) (Aminov, 2010).

El hecho de que no se haya descubierto nuevas clases de antibióticos desde 1980 ha supuesto que las líneas de investigación en la producción de nuevas moléculas se basen en la modificación de las preexistentes, a fin de mejorar sus características terapéuticas y combatir las resistencias emergentes. Así, se tiene constancia de la existencia de la resistencia a antibióticos desde 1940, con la publicación en la revista *Nature* del artículo “*An enzyme from bacteria able to destroy penicillin*” (Abraham y Chain, 1940).



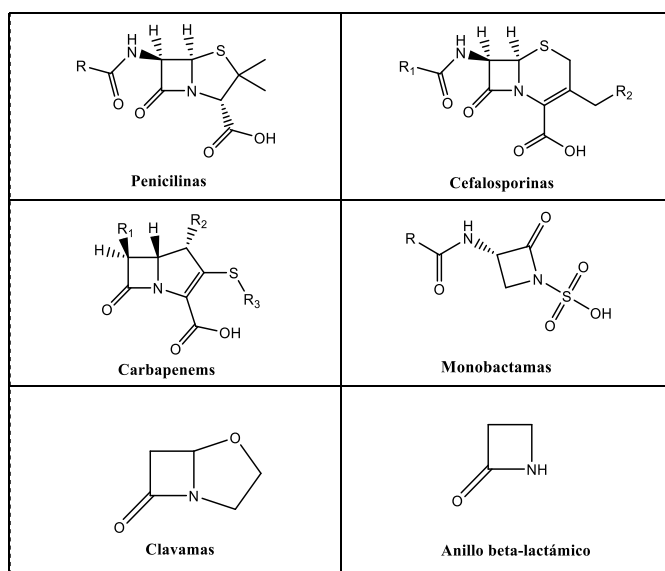
**Figura 1.** Cronograma del descubrimiento de los antibióticos. Adaptación de (Gumustas *et al.*, 2017).

La aparición de bacterias resistentes está relacionada con el uso extensivo que hoy en día se hace de los antibióticos, existiendo una correlación directa entre ambas variables (Goossens *et al.*, 2005). Ello ha derivado en un problema de talla mundial, suponiendo la causa de

aproximadamente 25.000 muertes anuales en la Unión Europea y 23.000 en Estados Unidos (Laxminarayan *et al.*, 2013). Además, las reacciones de hipersensibilidad o alergia a los medicamentos son otro de los problemas derivados del uso de antibióticos. Estas representan el 5 al 10% de las reacciones adversas a antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Gomes y Demoly, 2005). Así pues, el aumento de las resistencias a antibióticos, la alergia y la escasa aparición de nuevos antibióticos en el mercado han provocado que se prescriban innecesariamente antibióticos alternativos, suponiendo un problema tanto para la salud del paciente como para la sostenibilidad del sistema de salud. Así, por ejemplo, sustituir el uso de penicilina por otros antibióticos que pueden ser menos efectivos y más tóxicos para el paciente, resulta en un mayor número de hospitalizaciones más prolongadas.

## 1.2 Antibióticos $\beta$ -lactámicos.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son los más consumidos en la Unión Europea, suponiendo un 61% en el sector hospitalario español (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018). Estos se clasifican según su estructura química en penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, carbapenemas y clavamas, y se caracterizan por presentar el anillo  $\beta$ -lactámico en su composición química, el cual les confiere susceptibilidad a las enzimas  $\beta$ -lactamasas, lo que anula su función. Además, dicho anillo suele estar acompañado de un segundo anillo -a excepción de las monobactamas- de, o bien cinco, o seis miembros (Figura 2) (Ariza *et al.*, 2015). Dentro de cada grupo, la cadena lateral es la que determina las características terapéuticas del antibiótico (Neu, 1985).



**Figura 2.** Estructura química de las familias de antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Las penicilinas son bactericidas, es decir, provocan la muerte del microorganismo. El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la formación de la pared celular, interaccionando con la síntesis del peptidoglicano y provocando la pérdida de la integridad celular. Son efectivas tanto contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Gumustas *et*

*al.*, 2017). Los antibióticos de la familia de las penicilinas más populares son penicilina G, amoxicilina o ampicilina. Por otro lado, las cefalosporinas poseen el mismo mecanismo de acción que las penicilinas, aunque son menos sensibles a las  $\beta$ -lactamasas. Ejemplos de esta familia son el cefazolin, ceftriaxona y ceftaroline. Otra familia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos son las carbapenemas que se caracterizan por su amplio espectro de actividad, siendo el meropenem el antibiótico más popular de esta familia. Las monobactamas son compuestos sintéticos que suelen utilizarse en combinación con otros antimicrobianos. El aztreonam es la única monobactama que se emplea con fines clínicos (Gumustas *et al.*, 2017). Finalmente, las clavamas, donde destaca el ácido clavulánico, que se emplea en conjunto con otros  $\beta$ -lactámicos, siendo el amoxiclavulánico una de las combinaciones más utilizadas en clínica para el tratamiento de infecciones. De hecho, este fármaco está en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2017).

### **1.3 Inmunología de los beta-lactámicos.**

#### **1.3.1 Tipos de hipersensibilidad.**

La hipersensibilidad es una reacción inmune no deseada y en ocasiones exacerbada producida por el sistema inmunitario que requiere un estado pre-sensibilizado (inmune) del huésped. Se distinguen cuatro tipos de hipersensibilidad en función del mecanismo de acción.

##### Hipersensibilidad tipo I

La hipersensibilidad tipo I es una sensibilidad inmediata, produciéndose una alta y rápida actividad de IgE contra antígenos no patogénicos, denominados alérgenos. Las IgE son sintetizadas por las células  $T_H2$  tras la presentación del antígeno, y posteriormente se unen a mastocitos y basófilos por los receptores Fc $\epsilon$ RI. Este proceso se conoce como sensibilización. Una siguiente exposición al antígeno resulta en la activación y degranulación de mastocitos y basófilos, liberando diferentes compuestos que inducen a la reacción alérgica (histamina, leucotrienos, prostaglandina  $D_2$ , entre otros).

##### Hipersensibilidad tipo II

La sensibilidad mediada por anticuerpo o también conocida como hipersensibilidad tipo II, ocurre por dos mecanismos distintos. En ambos, las IgG reconocen proteínas de membrana, siendo posteriormente reconocidas por proteínas del complemento, que provocan la lisis mediante el complejo de ataque a membrana o bien por células polimorfonucleares o NK (*natural killer*), que llevan a la liberación de gránulos citotóxicos.

##### Hipersensibilidad tipo III

La hipersensibilidad tipo III se produce por la formación de un inmunocomplejo antígeno-anticuerpo, que lleva a la activación del complemento. La activación del complemento lleva a la activación de quimiotácticos para células inflamatorias como las polimorfonucleares. Además, se producen agregaciones plaquetarias, pudiendo llevar a trombosis.

## Hipersensibilidad tipo IV

La hipersensibilidad tipo IV es conocida como hipersensibilidad retardada (DTH), debido a que requiere uno o dos días para que los linfocitos CD4+ y CD8+ se sensibilicen. La activación de estas células T resultan en daño tisular, llegando a provocar fibrosis y necrosis del tejido (Actor, 2012).

### **1.4 Diagnóstico de alergia a antibióticos.**

La alergia a antibióticos se encuentra dentro de las reacciones de hipersensibilidad a medicamentos (DHR, en inglés), siendo principalmente el tipo I y tipo IV los mecanismos por los que se desencadena. La historia clínica no siempre conserva todos los detalles asociados a la reacción alérgica, bien por la heterogeneidad de los episodios o bien por propia causa humana, puesto que los datos recabados implican la versión del paciente, que puede no recordar, entre otros, el nombre del medicamento desencadenante de la reacción alérgica. Ello hace que el diagnóstico tenga que complementarse con pruebas que se extienden a tres niveles: *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*. El diagnóstico *in vivo* de alergia está basado en la prueba cutánea (*Prick test*), y de exposición al medicamento. Las pruebas *ex vivo* consisten en la prueba de activación de basófilos (BAT), la prueba de liberación de histamina (HRT) y la prueba de transformación linfocitaria (LTT). Los métodos *in vitro*, por su parte, consisten en la realización de inmunoensayos.

#### **1.4.1 Pruebas *in vivo*.**

Los métodos *in vivo* por excelencia son el *Prick test* y la prueba de exposición. El *Prick test* consiste en la introducción del alérgeno vía cutánea, pudiendo determinarse el diagnóstico en la aparición de urticaria o edema en la zona de aplicación. Esta prueba se encuentra bastante estandarizada en su aplicación a  $\beta$ -lactámicos aunque la sensibilidad que ofrece es bastante baja, precisando altas concentraciones del alérgeno que pueden resultar en falsos positivos (diagnóstico positivo en ausencia de alergia). Por otro lado, la prueba de exposición es la técnica de referencia para el diagnóstico de este tipo de reacciones. Consiste en la introducción vía oral del alérgeno a concentraciones crecientes en un ambiente hospitalario controlado. Esta práctica, aunque siendo considerada la técnica de referencia por su efectividad diagnóstica, presenta un alto riesgo para el paciente. Por ello, no en todos los casos puede ser aplicada, especialmente en pacientes que hayan sufrido reacciones adversas relacionadas con la alergia como la anafilaxis, el síndrome de Steven-Johnson o la necrólisis epidérmica tóxica (NET).

En global, estos métodos no ofrecen una solución efectiva al diagnóstico de alergias a  $\beta$ -lactámicos, por su baja sensibilidad y por tratarse de métodos invasivos en los que se pone en contacto al individuo con el posible causante de la hipersensibilidad. Por ello, actualmente, la práctica más habitual es realizar pruebas *ex vivo* e *in vitro* que superen y complementen los resultados de los métodos *in vivo* (Mayorga *et al.*, 2017).

### 1.4.2 Pruebas *ex vivo*.

La prueba de activación de basófilos (BAT) es la prueba *ex-vivo* más empleada en clínica. Esta se basa en la detección de marcadores celulares que los basófilos externalizan en su membrana tras el contacto con el alérgeno y la posterior degranulación. Dichos marcadores son cuantificados mediante citometría de flujo. Primero, se aíslan los basófilos del utilizando marcadores específicos como FcεRI, CCR3, CRTH2 y CD203c. Para la detección de la activación se utilizan otros como CD63 y el mismo CD203c, siendo el primero el que más aumenta su expresión después de la activación, aunque no específico de basófilos, sino también de macrófagos y plaquetas. La prueba de activación de basófilos no se encuentra estandarizada, por lo que no existen protocolos estandarizados en cuanto a marcadores, procedimientos y concentraciones de exposición. En β-lactámicos, su sensibilidad es del 50% al 78% y su especificidad del 89% al 97%.

En la HRT se mide la cantidad de histamina liberada por los basófilos tras la incubación de sangre heparinizada con el antibiótico en placas de microfibra de vidrio. La histamina se detecta por técnicas fluorimétricas. Se ha estudiado para la detección de alergia a ácido clavulánico, mostrando una sensibilidad del 55% y especificidad del 85%.

Por otra parte, la detección de hipersensibilidad retardada se realiza en base a la proliferación de linfocitos T específicos para el antibiótico, conocido con prueba de transformación linfocitaria (LTT). Se utilizan compuestos como la timidina tritiada -que se incorpora en el genoma de células en proliferación- y CFSE, molécula fluorescente que se diluye conforme se dividen los linfocitos T para poder observar la evolución de las poblaciones de linfocitos T. La sensibilidad varía del 58% al 89% y la especificidad del 85% al 100% en el caso de detección de reacciones a beta-lactámicos (Doña *et al.*, 2017).

### 1.4.3 Pruebas *in vitro*.

Los métodos *in vitro* se caracterizan por la detección cuantitativa de IgE. La detección de IgE específica (sIgE) requiere ensayos con una elevada sensibilidad debido a que las concentraciones presentes en sangre son muy bajas. De acuerdo a la clasificación RAST, un individuo es considerado alérgico cuando presenta en sangre una concentración de sIgE de 0,35 IU/mL (0,84 µg/L) (Blanca *et al.*, 2001).

En general, los ensayos para la determinación de sIgE operan inmovilizando conjugados hapteno-proteína en una superficie sólida, y detectando la presencia de sIgE con un segundo anticuerpo marcado. En función del tipo de marcaje se distinguen diferentes tipos de inmunoensayo: con un radioisótopo (RIA), una enzima catalizadora de una reacción colorimétrica (ELISA) o una enzima fluorescente (FEIA). El modo de anclaje del determinante antigénico a la fase sólida, la proteína transportadora utilizada, la densidad de haptenos por proteína y el tiempo de incubación son variables que pueden modificar la sensibilidad de los ensayos para la determinación de IgE específica. Las principales ventajas que presenta el inmunoensayo es el riesgo mínimo para el paciente, ya que se extrae una pequeña cantidad de muestra de sangre y la automatización del análisis. Sin embargo, no están exentos de

desventajas. Se debe garantizar que el determinante antigénico o epítopo esté expuesto para su reconocimiento por la sIgE y la toma de muestra debe realizarse en un período breve tras la reacción alérgica, ya que se ha detectado un descenso del nivel de IgE sérica con el tiempo.

El inmunoensayo comercial de referencia es el ImmunoCAP-FEIA. Este utiliza un conjugado de antibióticos-poli-L-lisina unido covalentemente a un polímero de celulosa (superficie sólida). Se encuentra disponible para penicilina G, penicilina V, amoxicilina y cefaclor. Su sensibilidad varía del 0-50% y presenta una especificidad de entre el 83,3 y 100%. El método RAST es otro de los inmunoensayos más utilizados, presentando una sensibilidad mayor que ImmunoCAP (43%-75%) aunque menor especificidad (68%-83%) (Doña *et al.*, 2017).

El correcto diagnóstico es vital para confirmar las sospechas de alergia en cualquier paciente. Los métodos *in vivo* por sí solos no son suficiente, debiendo combinarse con pruebas *in vitro*. Sin embargo, se precisa del desarrollo de nuevos métodos *in vitro* o bien la optimización de estos para aumentar la sensibilidad y especificidad clínica de las pruebas existentes.

#### **1.4 Determinantes antigénicos.**

Las reacciones alérgicas a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son provocadas por hipersensibilidad de tipo I y IV, siendo la primera la más común. Los antibióticos son moléculas pequeñas, sin capacidad de generar una respuesta inmune por sí mismos, precisando su unión a una proteína propia del organismo. En el proceso de reconocimiento de las IgE, por tanto, interviene la estructura completa del determinante antigénico, formado éste por el antibiótico -hapteno- y la proteína -carrier-. Además, la existencia de reactividad cruzada entre diferentes  $\beta$ -lactámicos sugiere que no sólo el anillo  $\beta$ -lactámico está involucrado en el reconocimiento, sino también la cadena lateral.

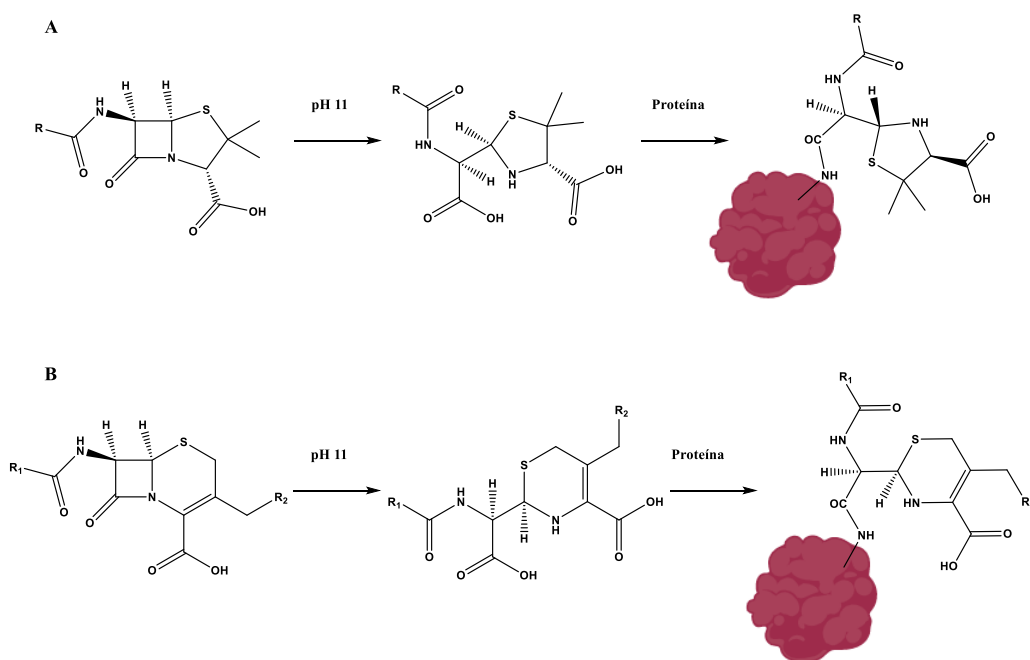
La albúmina de suero humano, HSA, es la proteína más abundante en el plasma humano a la par que la más relacionada con el proceso de haptización, presentando una alta capacidad para unirse a diferentes ligandos. Otras proteínas identificadas han sido la transferrina, inmunoglobulinas y proteínas intracelulares (Ariza *et al.*, 2015).

La forma en que se produce la haptización depende de los grupos reactivos del antibiótico capaces de interactuar con los propios que la proteína tiene disponibles. De esta manera, un antibiótico con diferentes grupos reactivos puede reaccionar por diferentes mecanismos con la misma proteína, generando una variedad de determinantes antigénicos o epítopos posibles relacionados con la hipersensibilidad.

En esta línea, Baldo *et al.* (2001) demostraron mediante estudios de inhibición de haptenos cuantitativa que las IgE presentes en el suero humano interactúan con partes diferentes del determinante, desde simplemente la cadena lateral o el anillo tiazolidínico o dihidrotiazina hasta la estructura completa con el anillo  $\beta$ -lactámico. De estos estudios deriva la necesidad de disponer de diferentes determinantes para obtener un diagnóstico eficaz de alergia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos.



El determinante antigénico más estudiado es el conocido como determinante mayor, por presentar dominancia cuantitativa en condiciones fisiológicas, además de estar relacionado con un alto porcentaje de las reacciones alérgicas, llegando al 75% en algunos estudios con bencilpenicilina (Gadde *et al.*, 1993). El ácido carboxílico generado tras la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico en medio básico genera la protonación de la amina y permite la posterior reacción con los grupos  $\epsilon$ -amino de lisina de la proteína, generando un enlace amida. El método de Bondaruk y Schneider (1995) es el más utilizado para la preparación de determinantes antigénicos. Este se basa en la apertura del anillo en un medio básico y conjugación directa a la proteína (Figura 3). El resto de estructuras generadas son consideradas determinantes menores, producto de la degradación y modificación de los antibióticos en sangre, así como de la conjugación a proteínas a través de otros grupos funcionales activos de los antibióticos. La utilización de estos determinantes menores complementan al determinante mayor en la detección de la alergia, siendo recomendada en los protocolos de diagnóstico en Europa y EE.UU (Ariza *et al.*, 2015).

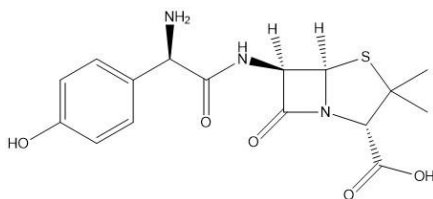


**Figura 3.** Formación del determinante mayor de (A) penicilinas y (B) cefalosporinas siguiendo el método de Bondaruk y Schneider (1995).

### 1.5 Amoxicilina.

La amoxicilina es una penicilina semisintética de espectro moderado, siendo actualmente el medicamento de referencia entre los de su clase: presenta una mejor absorción en el tracto intestinal, más capacidad para llegar a la concentración efectiva en el foco de la infección y mejor penetrabilidad en la pared celular de bacterias Gram-negativas. Se suele administrar de manera oral en conjunto con el ácido clavulánico, incrementando la efectividad del tratamiento al inhibir el efecto de las  $\beta$ -lactamasas (Karaman, 2015). Debido a su intensivo uso, la amoxicilina es actualmente la responsable la mayoría de reacciones alérgicas a antibióticos,

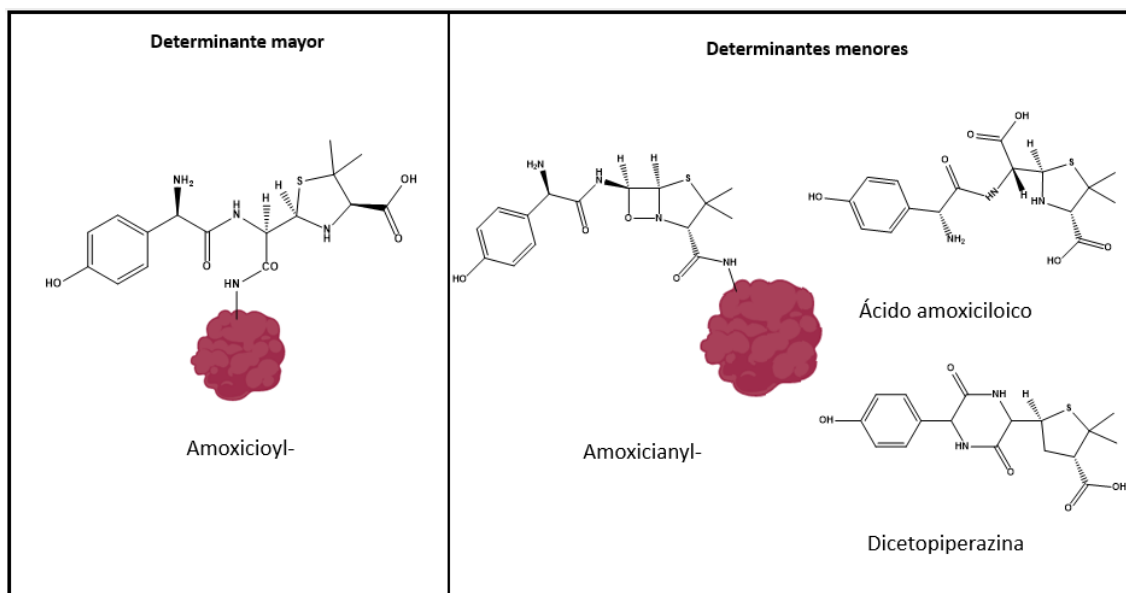
superando a la penicilina G (Doña *et al.*, 2017). Químicamente, se caracteriza dentro de la familia de las penicilinas por poseer una amina y un grupo fenol en su cadena lateral (Figura 4).



**Figura 4.** Estructura química de la amoxicilina.

Análogamente al resto de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, el determinante más estudiado para la detección de alergias es su determinante mayor, estando presente tanto en test *in vitro* como en ImmunoCAP. En el *Prick test*, se utiliza además la amoxicilina libre con capacidad de conjugarse en sangre, siendo recomendado por la ENDA (European Network for Drug Allergy). Sin embargo, la sensibilidad clínica es aproximadamente del 50% (Ariza *et al.*, 2015), es decir la mitad de los resultados son falsos negativos (diagnóstico negativo a pacientes alérgicos).

De esta baja sensibilidad surge la necesidad de incorporar nuevos determinantes menores al panel de haptenos utilizados para la detección de alergias a la amoxicilina (Figura 5). Torres y colaboradores (Torres *et al.*, 2010) evaluaron la inclusión del ácido amoxiciloico, producto de la hidrólisis de la amoxicilina, y la dicetopiperazina, producto de la autoaminólisis de la misma tanto en test *in vitro* como en el *Prick test*. Los resultados mostraron que el diagnóstico no mejoró significativamente, precisando por lo tanto de nuevos determinantes menores con el fin de aumentar la sensibilidad diagnóstica de los métodos *in vitro*.



**Figura 5.** Estructura química del determinante mayor y algunos determinantes menores de la amoxicilina.

## 2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fin de grado es la síntesis de nuevos determinantes menores de amoxicilina, así como la purificación y caracterización de estos para la preparación de determinantes antigénicos y su aplicación al desarrollo de métodos *in vitro* de diagnóstico de alergia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Para ello, se abordará el anclaje de la amoxicilina a proteínas *carrier* mediante el grupo funcional amino, estudiando la reactividad utilizando inmunoglobulinas G específicas como modelo para establecer probables patrones de sensibilización asociados a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en humanos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Reactivos, tampones y disolventes.

Las disoluciones amortiguadoras utilizadas fueron tampón MES 0,1M a pH 5,5 preparado a partir del ácido 2-morfolinoetanosulfónico (ACROS Organics, Madrid, España), PBS a pH 7,4 preparado a partir de NaCl (0,8 % m/v), KCl (0,2 % m/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,24 % m/v) y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,1 % m/v), PBST a partir de PBS y Tween-20 0,05 % (v/v), PB 10 mM a pH 7.4 a partir de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , tampón carbonato/bicarbonato 100 mM a pH 9,6 preparado a partir de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y  $\text{NaHCO}_3$ , tampón carbonato 50 mM a pH 11,0 a partir de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y tampón de dilución de los reactivos del inmunoensayo (Dr. Fooke, Neuss, Alemania). Las sales utilizadas para la preparación de los tampones fueron suministradas por Scharlau (Sentmenat, Barcelona, España).

Para la síntesis de haptenos y conjugados amoxicilina-glutaraldehído se utilizó amoxicilina ácida, glutaraldehído en disolución acuosa al 25% y borohidruro de sodio - $\text{NaBH}_4$ - (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Las proteínas utilizadas en la conjugación fueron albúmina de suero humano (HSA), proteína 2-P2- y estreptavidina de *Streptomyces avidinii*, todas ellas suministradas por Sigma-Aldrich. La concentración de proteína de los conjugados preparados se cuantificó mediante el método de Bradford, utilizando el colorante Coomassie Blue (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad, Madrid, España).

Para la síntesis de haptenos mediante la biotilación de la amoxicilina se utilizó amoxicilina sódica del fármaco Clamoxyl, Biotina-NHS-éster sintetizada por el grupo de investigación y trietilamina de Sigma Aldrich.

Para la realización de espectros de resonancia magnética (RMN) se utilizó agua deuterada - $\text{D}_2\text{O}$ - al 99.8% de ACROS Organics.

Para la evaluación y caracterización de los conjugados se utilizó un inmunoensayo previamente optimizado por el grupo de investigación del Departamento de Química e inmunoglobulinas G procedentes de suero de conejo previamente inmunizado con determinantes antigénicos de amoxicilina. Las inmunoglobulinas G utilizadas fueron: 1) rIgG1 de conejo inmunizado con conjugado 1 (determinante mayor); 2) rIgG2 de conejo inmunizado con conjugado 2 (determinante menor); 3) rIgG3 de conejo inmunizado con conjugado 3 (determinante mayor); y 4) rIgG4 de conejo inmunizado con conjugado 4 (determinante menor).

El anticuerpo secundario utilizado fue una IgG de cabra anti-IgG de conejo marcado con HRP (peroxidasa de rábano) y el sustrato para el revelado 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) de SDT-Reagents (Baesweiler, Alemania).

Para el análisis con muestras de suero, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE humana (Ingenasa, Madrid, España), un anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con HRP (GAM-HRP) como anticuerpo secundario y el sustrato TMB. Las muestras de suero fueron

proporcionadas por el Hospital Universitari i Politècnic La Fe, bajo consentimiento informado de los pacientes. Como controles positivos se utilizó Omalizumab procedente del fármaco Xolair e IgG de suero de ratón de Sigma Aldrich.

### **3.2 Purificación de la amoxicilina.**

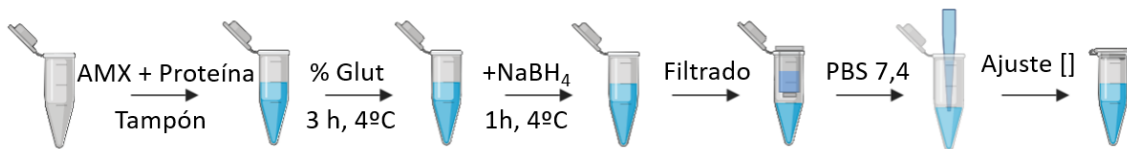
El producto de partida de amoxicilina (96%) se purificó por precipitación ácida. Para ello, se pesaron 2,0 g de amoxicilina y se colocaron en un matraz redondo de 250 mL. A continuación, se añadieron 40 mL de agua desionizada y 350  $\mu$ L de NaOH 10 M, hasta llegar a pH 14. La disolución se mantuvo en agitación durante dos horas. Transcurrido el tiempo, el matraz fue introducido en un baño de hielo y la disolución se acidificó hasta pH 4 utilizando HCl 1M. La acidificación provocó la aparición de un precipitado blanco correspondiente a la amoxicilina. El precipitado se filtró a vacío durante 1 h utilizando un matraz Kitasato, hasta el secado completo.

El producto se caracterizó por mediante  $^1\text{H}$ -RMN -resonancia magnética nuclear de hidrógeno-. En un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN cada señal obtenida se corresponde con un átomo de hidrógeno o de varios con el mismo entorno químico, teniendo cada compuesto un espectro característico. La eliminación de las impurezas fue confirmada ya que todas las señales correspondían a hidrógenos de la amoxicilina. Para la obtención del espectro, dos miligramos de amoxicilina purificada se introdujeron en 600  $\mu$ L de  $\text{D}_2\text{O}$  en un vial específico para RMN. Todos los  $^1\text{H}$ -RMN fueron llevados a cabo en un equipo TopSpin Bruker de 400 MHz, con 16 escaneos y pulsos de 9.5  $\mu$ s.

### **3.3 Síntesis y purificación de conjugados de amoxicilina-glutaraldehído-HSA.**

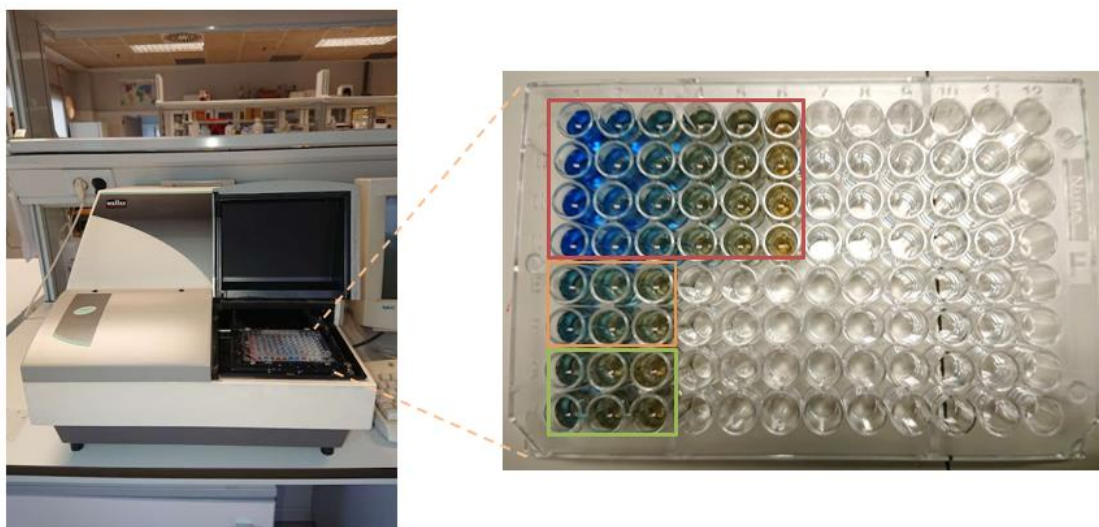
Para la conjugación de la amoxicilina mediante la ruta del glutaraldehído, 2,0 mg de la proteína utilizada fueron disueltos en 1 mL de PBS a una concentración de 2 mg/mL. En agitación, se añadió la amoxicilina ácida previamente modificada a una molar proteína-amoxicilina 1:640. Tras ello, se añadió un 0,5% en volumen de la disolución de glutaraldehído y se dejó reaccionar en agitación durante tres horas en nevera a una temperatura de 4°C. La reacción de conjugación forma bases de Schiff,  $(\text{R}_1, \text{R}_2)\text{-C=N-R}_3$ , que fueron reducidas por la adición de  $\text{NaBH}_4$  en campana de gases. Transcurridos cinco minutos tras la adición, se volvió a introducir en nevera a 4°C, dejando reaccionar durante una hora más.

Transcurrido el tiempo, el volumen de reacción fue filtrado en una columna Amicon Ultra-0.5 10K (Merck, Valencia, España) con cuatro procesos de centrifugación a 12500 rpm de cinco minutos con adición de PBS, quedando los conjugados retenidos en el filtro y eliminándose la amoxicilina y glutaraldehído sin reaccionar. Finalmente, la columna fue colocada en sentido inverso en un Eppendorf y centrifugada durante 2 minutos a 3400 rpm. El volumen obtenido se llevó a 1,0 mL con PBS para cada conjugado. El esquema simplificado del proceso se encuentra en la Figura 6.



**Figura 6.** Esquema general del proceso de obtención de conjugados de amoxicilina mediante la vía del glutaraldehído.

La concentración de conjugado se determinó mediante un ensayo colorimétrico de Bradford. Para ello, se obtuvo una recta de calibrado utilizando disoluciones patrón de HSA de concentración conocida (25-400 mg/L) en PBS. De cada conjugado se prepararon tres diluciones, 1/10, 1/20 y 1/40. 25  $\mu$ L de cada una de las diluciones fueron introducidos en una placa ELISA de 96 pocillos. A cada uno de los pocillos se añadieron 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford diluido 1/5 (v/v) con agua destilada, dejando revelar durante 5 minutos. La medida de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro (Wallac, VICTOR 1420 multilabel counter) a 595 nm (Figura 7). Los valores de absorbancia se interpolaron en la recta de calibrado, obteniéndose así la concentración de los conjugados. Los conjugados se llevaron a una concentración de 1,0 mg/mL en PBS y fueron conservados a 4 °C.

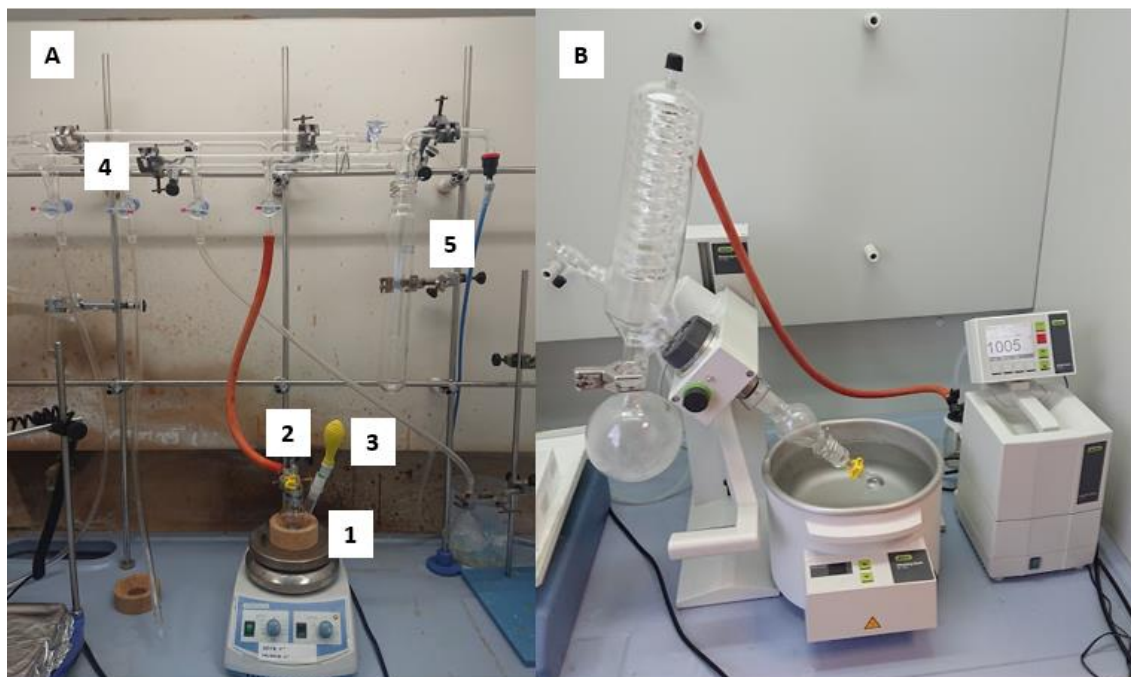


**Figura 7.** Imagen del equipo de lectura multipocillo para el ensayo de Bradford. En la figura se muestra los resultados de la recta de calibrado (cuadrado rojo) y de dos conjugados (naranja y verde).

### 3.4 Síntesis de conjugados de amoxicilina biotinilada.

La síntesis del hapteno se basó en el método de Ariza et al. (Ariza *et al.*, 2014) con modificaciones. Una relación equimolar de amoxicilina sódica (70 mg; 0,18 mmol; 1 equiv.) y biotina-NHS-éster (61,2 mg; 0,18 mmol; 1 equiv.) se introdujeron en un matraz de dos bocas. Después, se procedió a la desgasificación del matraz. Para ello, la boca vertical se conectó a una línea Schlenk con la que se realizaron tres ciclos de aplicación de vacío seguidos del llenado del matraz con argón. Tras inducir la atmósfera inerte, se introdujeron 3,0 mL de metanol, dejando

disolver los reactivos en agitación durante 10 minutos. Entonces se añadió un volumen equivalente de trietilamina (25,3  $\mu\text{L}$ ; 0,18 mmol; 1 equiv.) y se dejó reaccionar durante dos horas en un baño de hielo. Transcurrido el tiempo, se dejó reaccionar una hora más a temperatura ambiente. Una vez realizada la síntesis, el volumen de reacción fue transferido a un matraz más pequeño para la eliminación del disolvente mediante rotaevaporación. El producto obtenido se dejó secar conectado al vacío toda la noche para asegurar la completa eliminación del metanol. El rendimiento obtenido fue 70%. El sistema utilizado, así como el rotavapor, se muestran en la figura 8.



**Figura 8.** (A) Esquema del sistema montado para la síntesis de amoxicilina biotinylada. [1] Matraz de reacción; [2] Boca vertical; [3] Boca lateral; [4] Línea Schlenk; [5] Trampa de seguridad. (B) Sistema de rotaevaporación.

Para la caracterización del producto se emplearon dos métodos diferentes: cromatografía en capa fina (TLC) y  $^1\text{H}$ -RMN. El  $^1\text{H}$ -RMN fue llevado a cabo en las mismas condiciones que las descritas en la purificación de amoxicilina a excepción del disolvente, siendo en este caso  $\text{D}_2\text{O}$ . La TLC se llevó a cabo utilizando una lámina de gel de sílice sobre aluminio como fase sólida (Sigma Aldrich). La fase móvil utilizada fue de acetato de etilo, agua destilada y ácido acético en una relación de volumen 6,5:2:1,5.

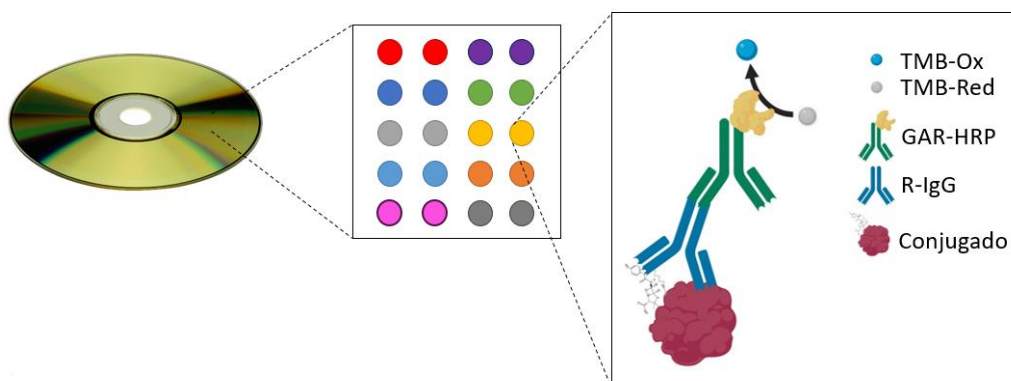
Para la preparación del conjugado antigénico, se añadió un exceso de amoxicilina biotinylada a una disolución de estreptavidina en una relación proteína-hapteno 1:10. La reacción de conjugación tuvo lugar durante 1 hora. La concentración final del conjugado de estreptavidina-amoxicilina fue de 1,0 mg/mL.

### 3.5 Protocolo de evaluación de conjugados.

La evaluación de los conjugados se llevó a cabo mediante inmunoensayo, utilizando la tecnología de disco compacto DVD. Esta tecnología permite realizar inmunoensayos en formato micromatriz mediante la inmovilización de los conjugados en la superficie del disco. El principio del inmunoensayo consiste en incubar la molécula anclada con la muestra problema, y detectar la inmunointeracción con un anticuerpo secundario marcado con HRP. La adición del sustrato enzimático genera un producto insoluble coloreado cuya densidad óptica se relaciona directamente con la concentración de IgE específica de la muestra.

Los conjugados fueron impresos en forma de microgotas a una concentración de 40 mg/L formando micromatrices de 5 filas y 4 columnas, con cada conjugado por duplicado. El tampón de impresión para los conjugados fue carbonato/bicarbonato 100 mM a pH 9,6. La impresión se llevó a cabo en condiciones de humedad (90%) en un dispensador sin contacto (AD1500, Biodot, Irvine, CA). En cada disco se imprimieron 20 micromatrices. Tras la impresión, los discos se incubaron durante 12 horas a 37 °C. Se utilizaron dos tipos de inmunoensayo diferentes, realizándose por una parte una evaluación de los conjugados con rIgG y otra utilizando una muestra de suero procedente de pacientes alérgicos a amoxicilina.

Para comenzar el inmunoensayo con rIgG, el disco impreso se lavó con PBST y agua destilada, y se secó en una centrífuga adaptada para discos. En la primera etapa, se añadieron 25 µL de IgG de conejo sobre cada array a diluciones de 1/500, 1/2500, 1/12.500 y 1/125.000 en tampón de dilución. Se utilizaron cuatro sueros provenientes de diferentes conejos inmunizados ante la amoxicilina: rIgG1, rIgG2, rIgG3 y rIgG4. Tras una incubación de 15 minutos, se volvió a lavar el disco con PBST y agua destilada, secándose posteriormente por centrifugación. La segunda etapa consistió en la adición de 25 µL del anticuerpo secundario GAR-HRP a una dilución 1/500 en tampón de dilución y otra incubación de 15 minutos. Tras el tercer lavado, de manera idéntica a los anteriores, se añadieron 25 µL del sustrato colorimétrico TMB, previamente atemperado a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras 15 minutos de incubación, el disco se lavó con agua destilada y secado para su posterior lectura. El esquema del ensayo se muestra en la figura 9.

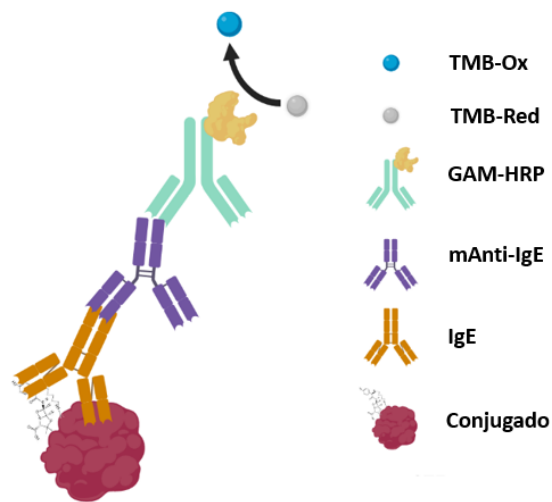


**Figura 9.** Inmunoensayo realizado para evaluar el reconocimiento de los conjugados por rIgGs de conejos inmunizados.



El ensayo para la determinación de IgE consintió en las mismas etapas con algunas modificaciones (Figura 10). En la primera etapa, se añadieron 25  $\mu$ L de suero de paciente sobre cada array y se dejó incubar durante 30 minutos. En la segunda etapa se añadieron 25  $\mu$ L un anticuerpo anti-IgE humana a una dilución 1/1000 en tampón de dilución y se incubó durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se añadieron 25  $\mu$ L de anticuerpo secundario GAM-HRP a una dilución 1:100 y se dejaron incubar 15 min. Finalmente, se añadió el sustrato TMB como se ha descrito. Entre etapas se hacían lavados con PBST y agua como se ha descrito anteriormente para el ensayo con rIgGs.

La lectura se llevó a cabo en un lector de discos ópticos Lab-Player. El lector produce un haz láser a 650 nm que es reflejado por la superficie del DVD. La presencia de sustrato precipitado produce una dispersión del haz láser, atenuando la señal detectada por el fotodiodo detector. El nivel de atenuación de la señal se relaciona con la concentración de rIgG o IgE (Morais *et al.*, 2016). Los valores de señal fueron obtenidos mediante el programa Bio-disk, desarrollado en el grupo de investigación.

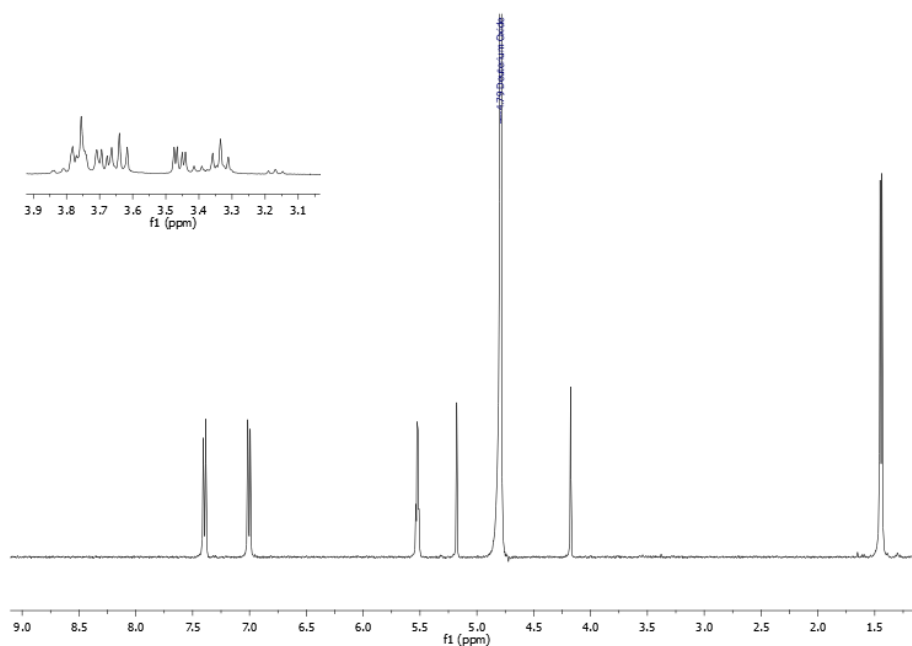


**Figura 10.** Esquema del inmunoensayo para la detección de IgE específicas.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Evaluación de la purificación de la amoxicilina.

La amoxicilina ácida es un compuesto cuya solubilidad en agua a 25 °C es 3,43 mg/mL, siendo dependiente del pH, aumentando en condiciones básicas y disminuyendo en condiciones ácidas (Bhattacharyya y Cort, 1978). El aumento del pH permite la completa solubilidad de la amoxicilina de partida, incluyendo los excipientes, debido a la protonación de la amina presente en la cadena lateral. Al neutralizar la disolución y después acidificar en un baño de hielo a 0 °C dicha solubilidad baja, precipitando la amoxicilina y quedándose retenida posteriormente en el filtro, mientras que los excipientes se mantienen en la fase líquida. El  $^1\text{H}$ -RMN de la amoxicilina comercial muestra impurezas en la zona de 3,00 y 3,65 ppm en forma de multipletes sin definir, que desaparecen tras la purificación (Figura 11).  $^1\text{H}$ -RMN de la amoxicilina purificada (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.40 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.00 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 5.52 (dd,  $J = 7.6, 3.8$  Hz, 2H), 5.18 (s, 1H), 4.18 (s, 1H), 1.44 (d,  $J = 6.6$  Hz, 6H).

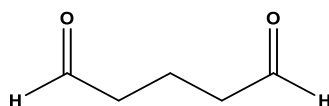


**Figura 11.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de la amoxicilina tras la purificación. La imagen ampliada corresponde a la región de 3,1 ppm a 3,9 ppm de la amoxicilina comercial.

El rendimiento promedio de la purificación fue del 33%, calculado a partir del cociente entre la masa de amoxicilina recuperada y la masa de amoxicilina comercial utilizada.

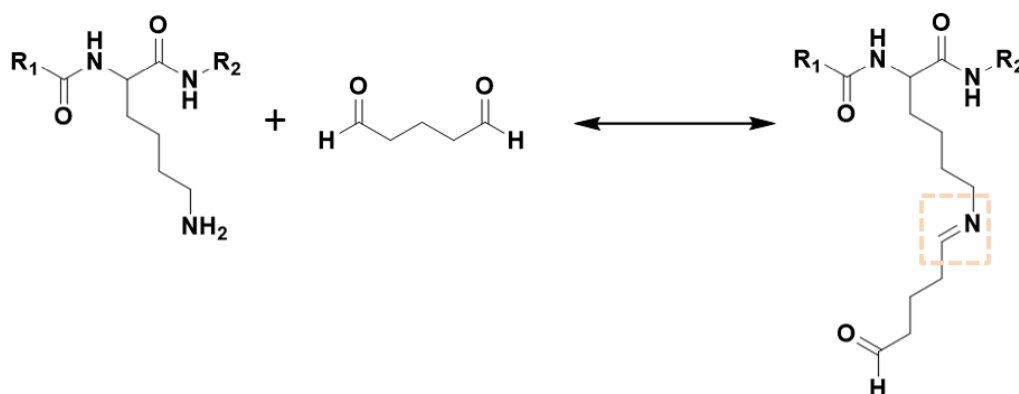
### 4.2 Obtención de conjugados mediante reacción con glutaraldehído.

La primera vía de síntesis testada fue la realizada mediante la ruta del glutaraldehído. El glutaraldehído o 1,5-pentanodial, es un compuesto de 5 carbonos con dos grupos aldehído en sus extremos (Figura 12).



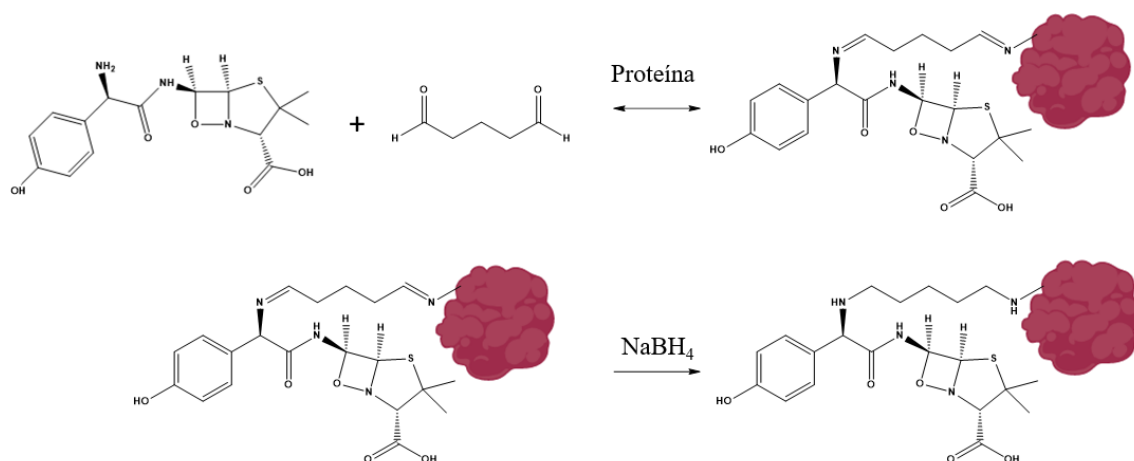
**Figura 12.** Estructura del glutaraldehído monomérico.

El glutaraldehído se suele presentar en disolución acuosa, a pH ácido, donde se encuentra en diferentes formas, debido a procesos de hidratación (alcoholes) y ciclación (Kildeeva *et al.*, 2009). Conforme se aumenta el pH, el glutaraldehído tiende a polimerizar, formando estructuras más complejas. A pesar de su extensivo uso, no se conoce qué especies tienen mayor capacidad de reaccionar con los grupos amino. Sin embargo, el mecanismo de reacción más aceptado es el de la formación de bases de Schiff mediante el ataque nucleofílico a una amina terciaria, como es el caso de las  $\epsilon$ -amino terminal del aminoácido lisina en las proteínas (Figura 13), debido a la acción de la forma monomérica. Así, dos grupos amino son unidos vía el glutaraldehído, formando un enlace que no es estable a pH ácido y varios rangos de temperatura, pudiendo revertir. La adición de un agente reductor, como el  $\text{NaBH}_4$  o el cianoborohidruro de sodio -  $\text{NaCNBH}_3$ - permite la reducción de la base de Schiff, formando una amina secundaria mucho más estable (Migneault *et al.*, 2004).



**Figura 13.** Reacción química entre el glutaraldehído y el grupo  $\epsilon$ -amino terminal del aminoácido lisina de una proteína. El cuadro naranja muestra la base de Schiff formada.

Como la amoxicilina presenta una amina en su cadena lateral, se consideró esta vía para su conjugación a diferentes proteínas mediante el glutaraldehído, generando un potencial determinante antigénico que mantiene intacta la estructura del anillo  $\beta$ -lactama. El determinante mayor se genera al unir el hapteno a la proteína mediante la apertura del anillo  $\beta$ -lactámico. En este caso, al no modificarse la estructura del anillo, se trata de un determinante menor. El esquema de la reacción de haptización mediante glutaraldehído se muestra en la figura 14.



**Figura 14.** Proceso de haptización de la amoxicilina a una proteína utilizando glutaraldehído como entrecruzador.

Teniendo en cuenta que la reactividad del glutaraldehído es variable en función del pH, se hizo una primera aproximación a la conjugación mediante el uso de cuatro tampones diferentes: MES 0,1 M a pH 5,5, PBS a pH 7,4, tampón carbonato/bicarbonato 100 mM a pH 9,6 y tampón carbonato a pH 11,0. Se utilizó una relación molar 1:40 proteína-amoxicilina, así como un 1% de glutaraldehído (v/v), siguiendo el protocolo de Hermanson (2013) con modificaciones. En total, se utilizaron dos proteínas: la HSA y P2. Tras la reacción de conjugación, las disoluciones fueron filtradas con un filtro de 10 kDa para eliminar los restos de amoxicilina y glutaraldehído no reaccionados, así como poder realizar un cambio de tampón a PBS en el caso de las conjugaciones realizadas con otras disoluciones amortiguadoras.

Tras las reacciones de conjugación, se estimó la concentración de los conjugados utilizando el ensayo de Bradford. En dicho ensayo, el colorante Coomassie Blue se une a ciertos aminoácidos básicos y aromáticos, produciendo una coloración azul con un máximo de absorbancia a 595 nm. Sólo la HSA responde al ensayo de Bradford, por lo que los resultados se extrapolaron a los conjugados de P2 para poder establecer una concentración final de 1,0 mg/mL para los conjugados. El rendimiento de purificación obtenido fue del 75%. En la tabla 1 se muestran los conjugados generados, así como la concentración estimada tras el ensayo de Bradford utilizando un calibrado de HSA.

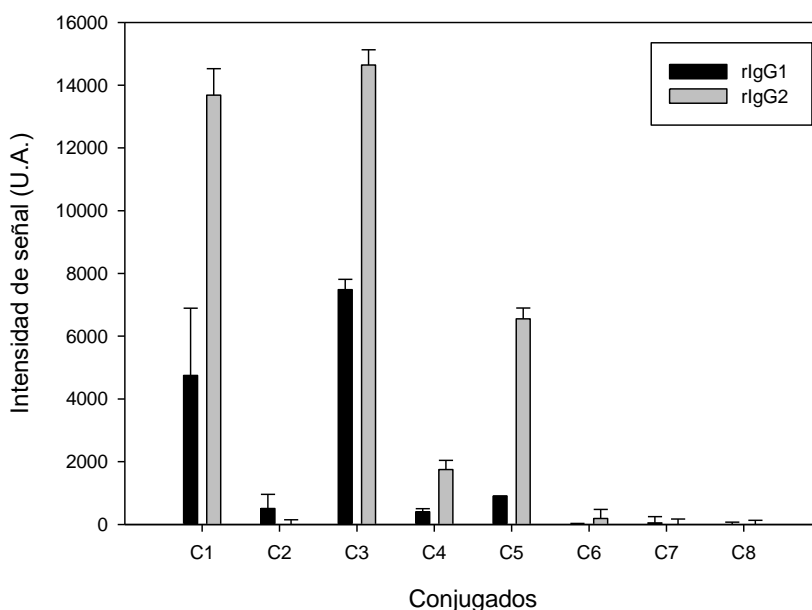
**Tabla 1.** Conjugados generados para la evaluación del pH de conjugación (C1-C8).

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
<b>Proteína</b>	HSA	P2	HSA	P2	HSA	P2	HSA	P2
<b>pH</b>	5,5	5,5	7,4	7,4	9,6	9,6	11,0	11,0
<b>Concentración (mg/mL)</b>	1,0	1,0	1,5	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0

Para evaluar la efectividad de los determinantes antigénicos se evaluó la capacidad de reconocimiento de anticuerpos rIgG en un inmunoensayo. Las rIgG se obtuvieron partir de sueros de individuos inmunizados previamente con otro conjugado:

- rIgG1: determinante mayor con KLH como proteína carrier.
- rIgG2: determinante menor amoxianyl- con espaciador de cinco carbonos y KLH.
- rIgG3: determinante mayor con espaciador de cinco carbonos y KLH.
- rIgG4: determinante menor amoxianyl- y blue protein.

Los resultados obtenidos utilizando rIgG1 y rIgG2 se muestran en la figura 15. Como se observa, los mejores resultados en cuanto a intensidad de señal se obtuvieron con las rIgG2. Además, el patrón de reconocimiento de las dos rIgG utilizadas fue similar, es decir, el conjugado con mayor intensidad de señal lo fue para las ambas, mientras que el de menor intensidad también.



**Figura 15.** Diagrama de barras de la intensidad de señal obtenida en el inmunoensayo con los determinantes antigénicos de HSA y P2.

Los resultados mostraron que el conjugado que mayor intensidad de señal generó fue el realizado en tampón PBS a pH 7,4. Los bajos valores obtenidos a pH 9,6 y 11,0 pueden ser explicados por la tendencia del glutaraldehído a polimerizar entre sí conforme se aumenta el pH en vez de intervenir en la conjugación entre la proteína y la amoxicilina (Kildeeva *et al.*, 2009). La conjugación a pH 5,5, a pesar de darse en un pH ácido donde el glutaraldehído es más estable y menos reactivo con las aminas, resultó en una señal ligeramente más baja que a pH 7,4. La disolución tampón utilizada para las siguientes conjugaciones fue el PBS 7,4 por la mayor intensidad de señal obtuvo en el inmunoensayo.

Por lo que respecta a las proteínas, la HSA resultó el *carrier* más efectivo para obtener un reconocimiento de las rIgG. La P2 obtuvo un valor nulo en tres de los tampones a excepción del PBS a pH 7,4. Además, los conjugados de P2 tendieron a precipitar con el tiempo, indicando asociaciones de alto peso molecular debido a un gran entrecruzamiento entre las moléculas de proteína. El alto grado de entrecruzamiento concuerda con la alta densidad de lisinas - lisinas/aminoácidos totales- que contiene la P2, más del doble que la HSA, haciéndola más propensa a múltiples uniones y por tanto asociaciones más complejas.

Visto los resultados obtenidos en la primera aproximación a la conjugación, se decidió preparar una segunda tanda de conjugados variando la relación molar amoxicilina-proteína, y reduciendo el porcentaje de glutaraldehído (v/v), esperando así rendimientos de haptización mayores por disminución del grado de entrecruzamiento proteico y polimerización. Los conjugados generados se muestran en la tabla 2.

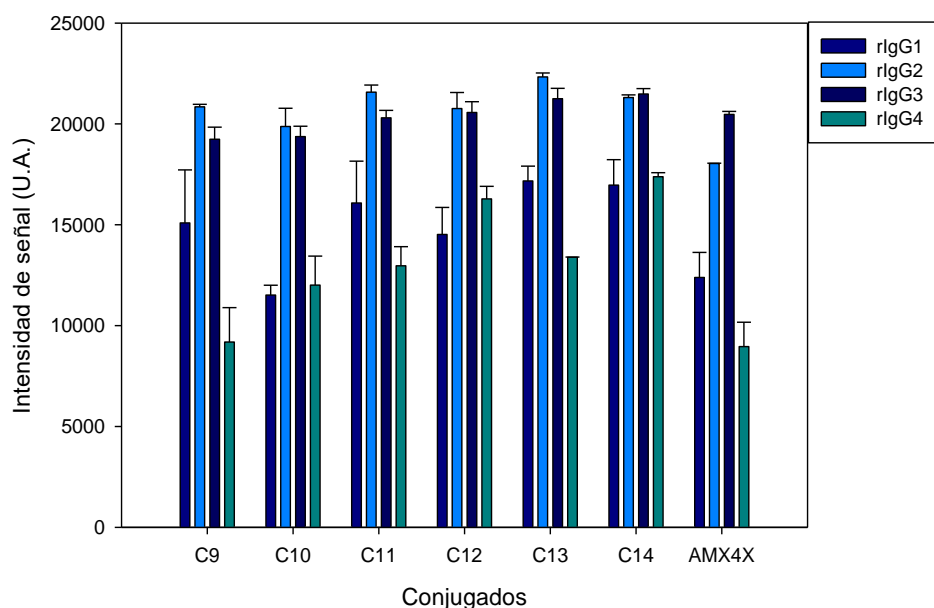
**Tabla 2.** Conjugados generados para la evaluación de la relación molar y porcentaje de glutaraldehído (C9-C18).

	<b>Proteína</b>	<b>Relación molar</b>	<b>% Glutaraldehído</b>
<b>C9</b>	HSA	1:40	0,1
<b>C10</b>	HSA	1:40	0,5
<b>C11</b>	HSA	1:160	0,1
<b>C12</b>	HSA	1:160	0,5
<b>C13</b>	HSA	1:640	0,1
<b>C14</b>	HSA	1:640	0,5
<b>C15</b>	P2	1:40	0,1
<b>C16</b>	P2	1:40	0,5
<b>C17</b>	P2	1:160	0,1
<b>C18</b>	P2	1:160	0,5

Los conjugados se prepararon siguiendo los mismos pasos que en la síntesis anterior, con una reducción con NaBH<sub>4</sub> y posterior filtración. En este caso, los rendimientos de recuperación de la proteína tras el filtrado, evaluado mediante el ensayo de Bradford, fue del 80%. Los conjugados fueron llevados a una concentración de 1,0 mg/mL e impresos en el disco para su evaluación mediante inmunoensayo con rIgG.

El resultado obtenido con la proteína P2 volvió a ser negativo, no obteniendo respuesta en forma de señal durante el inmunoensayo con ninguno de los cuatro conjugados generados.

En cuanto a la HSA, los resultados se muestran en la figura 16. Estos corresponden a los obtenidos con una dilución 1/500 de rIgGs.



**Figura 16.** Intensidad de señal obtenida para los conjugados C9 a C14 en el inmunoensayo con las cuatro rIgGs.

Todos los conjugados generados fueron reconocidos, en mayor o menor medida, por las rIgG, indicando un correcto anclaje de la amoxicilina a la proteína. Además, el valor de señal obtenido para los compuestos es comparable al obtenido por el conjugado de referencia, AMX4X. Dicho conjugado ha sido desarrollado por el grupo de investigación por la vía del determinante mayor.

En cuanto al reconocimiento molecular, las rIgG con más afinidad hacia los compuestos fueron IgG2 e IgG3, correspondientes al determinante mayor con un espaciador de 5 carbonos y al determinante menor amoxianyl- con el mismo espaciador. Estos resultados concuerdan con el determinante generado mediante glutaraldehído, con un brazo de 5 carbonos, en el caso del entrelazamiento mediante la forma monomérica.

Las señales más bajas fueron las obtenidas con el IgG4, posiblemente por el propio conjugado por el que fueron generados, el único que no estaba realizado con KLH como carrier, siendo una proteína ampliamente utilizada en el ámbito de la biotecnología para la generación de anticuerpos (Aarntzen *et al.*, 2012).

Finalmente, se puede concluir que, aunque el anclaje se genere a partir del grupo amino primario de la cadena lateral, modificándola, el reconocimiento no se vio aminorado.

El siguiente paso fue la síntesis del hapteno sin la presencia de proteína, intentando obtener una molécula de amoxicilina funcionalizada con glutaraldehído con el fin de caracterizar la estructura del hapteno por  $^1\text{H-NMR}$ . Para ello, se abordó la síntesis en matraz de vidrio.

La primera aproximación fue la elección del disolvente adecuado para poder llevar a cabo la reacción. La solubilidad de la amoxicilina es uno de los parámetros más importantes, ya que el volumen de reacción debe ser mínimo a fin de facilitar la futura eliminación del disolvente. Se

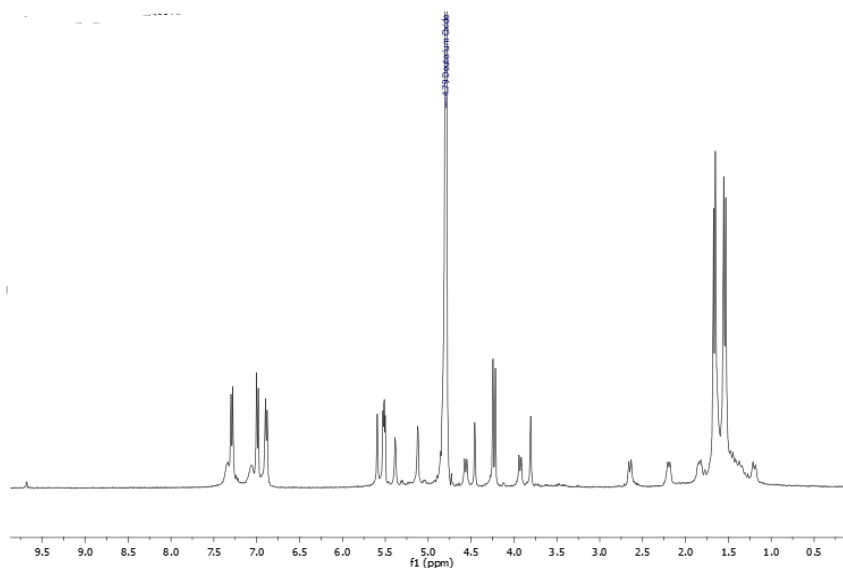
estudió la solubilidad de la amoxicilina en cuatro disolventes diferentes: agua, N,N-dimetilformamida (DMF), metanol (MeOH) y diclorometano (DCM).

En este estudio se pesó 1,5 mg de amoxicilina en diferentes tubos Eppendorf, a los cuales se les añadió progresivamente disolvente hasta obtener una disolución de amoxicilina. Los resultados del ensayo mostraron que el DCM era incapaz de disolver totalmente a la amoxicilina en los volúmenes utilizados. El agua y el metanol mostraron una capacidad de disolución de 3,6 mg/mL y 5,1 mg/mL respectivamente. El DMF fue el disolvente más eficaz, con una solubilidad mayor de 6,6 mg/mL, para el rango de volúmenes probados. A continuación, se realizó la síntesis utilizando los tres disolventes anteriormente mencionados. Las primeras síntesis se realizaron en agua destilada, utilizando tres relaciones molares diferentes amoxicilina-glutaraldehído; 1:1, 2:1 y 4:1. El tiempo de reacción establecido fue de tres horas, teniendo en cuenta que las reacciones con glutaraldehído son relativamente cortas en el tiempo, interaccionando casi al completo tras el paso de 90 minutos (Fujiwara *et al.*, 1999). Transcurridas las tres horas, se eliminó el disolvente mediante rotavapor, obteniendo un precipitado amarillento. Los productos sintetizados se caracterizaron por <sup>1</sup>H-RMN, mostrando la ausencia de reacción entre la amoxicilina y el glutaraldehído, así como una degradación de la primera.

El siguiente paso fue el estudio de los disolventes MeOH y DMF. Las condiciones de prueba en metanol fueron una relación molar 1:1 y 3 horas de reacción, dando como resultado la misma degradación y falta de reactividad obtenida en agua destilada. En el caso del DMF se probaron diferentes tiempos -1h, 2h y 16 h- manteniéndose la relación molar 1:1. Para eliminar el DMF se tuvo que añadir tolueno a la disolución, debido a que forman un azeótropo, facilitando la evaporación. Sin embargo, no se consiguió eliminar el disolvente en su totalidad, observándose también degradación de la amoxicilina en las condiciones probadas.

La última aproximación a la síntesis en matraz se realizó utilizando tampón PB 10 mM a pH 7,4. Para ello, se disolvió amoxicilina (36,5 mg; 0,1 mmol; 1 equiv.) en 12 mL de PB 10 mM a pH 7,4 utilizando un matraz redondo de 100 mL. Tras la completa disolución de la amoxicilina, se añadió glutaraldehído (37,7  $\mu$ L; 0.1 mmol; 1 equiv.) en campana de gases y se dejó reaccionar en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. El disolvente fue eliminado por rotaevaporación, obteniéndose un producto sólido de color amarillo. El rendimiento del proceso fue del 80%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.58 (s, 1H), 5.55 – 5.48 (m, 1H), 5.37 (s, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.56 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.46 (s, 1H), 4.23 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 3.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 2.63 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 2.18 (s, 1H), 1.82 (s, 1H), 1.67 (d, *J* = 9.8 Hz, 6H), 1.55 (d, *J* = 9.3 Hz, 6H), 1.49 – 1.13 (m, 3H) (Figura 17).





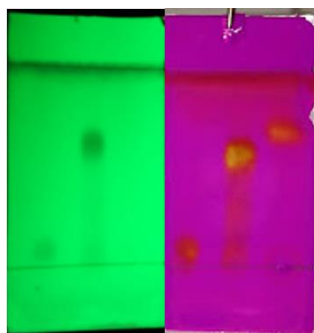
**Figura 17.** Espectro de  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) producto de la reacción de amoxicilina-glutaraldehído con relación molar 1:1 en PB 10 mM.

Para continuar con la caracterización de la reacción se realizó una TLC (Figura 18). Una TLC es una cromatografía realizada en un soporte fino, como una placa de sílice  $-\text{SiO}_2-$ , donde la fase sólida no interacciona con el soluto. La capacidad de migración de los diferentes compuestos en la fase móvil, que depende su naturaleza química, es lo que permite la aparición de puntos en diferentes alturas de la placa.

El parámetro cuantitativo utilizado en la TLC es el factor de retención  $-R_f-$ , que se calcula dividiendo la distancia recorrida por el compuesto entre el recorrido total de la fase móvil, conocido como frente de avance. Los compuestos tienen un valor de  $R_f$  de entre 0 y 1.

Un factor clave en la puesta a punto de una TLC es la optimización de la fase móvil, que debe garantizar una correcta separación de los compuestos. En este sentido, se hizo un estudio de migración de amoxicilina, glutaraldehído y el producto de reacción en TLC empleando diferentes fases móviles. La mezcla que mejor resultados proporcionó fue de acetato de etilo, agua destilada y ácido acético en una relación de volumen 6:1:3. Se determinó que la adición de ácido acético hace migrar a la amoxicilina, aumentando su  $R_f$  según el porcentaje que este mismo representa en la fase móvil. Una fase móvil muy apolar evita la migración de la amoxicilina, mientras que una fase móvil muy polar, como el agua destilada, no genera una migración homogénea por la placa de sílice.

La aplicación de los reactivos sobre la placa de sílice se realizó utilizando un capilar con motivo de aumentar la resolución del punto. La placa se introdujo en un recipiente con cierre de vidrio esmerilado en el que previamente se había introducido la fase móvil. El resultado de la TLC se muestra en la figura 18. Se consiguió separar la amoxicilina  $-R_f$  de 0,13- del producto generado en el segundo carril, apareciendo a un  $R_f$  de 0,58. El glutaraldehído  $-$ tercer carril $-$  aparece a un  $R_f$  de 0,75. Se puede observar en el segundo carril la generación de un producto mayoritario, aunque con una reminiscencia de amoxicilina que quedó sin reaccionar y un halo entre ambos puntos.



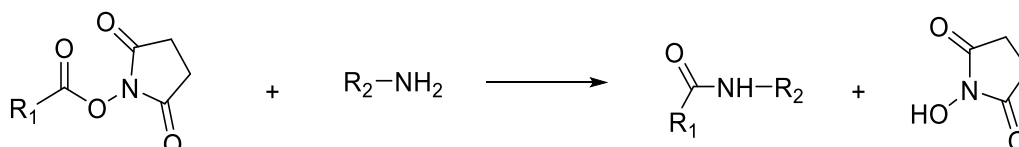
**Figura 18.** TLC realizada con el producto obtenido a partir de la relación molar 1:1 en PB durante 3 horas. Revelado de la izquierda izquierda por UV y derecha con  $KMnO_4$ .

Del conjunto del  $^1H$ -RMN y la TLC se pudo confirmar que había producto de reacción entre la amoxicilina y el glutaraldehído en el medio PB 10 mM 7,4. Sin embargo, se aprecian más señales que las cabría esperar de una reacción del monómero con una molécula simple de amoxicilina en el espectro de  $^1H$ -NMR. Esto se explica por la propia heterogeneidad del glutaraldehído y la naturaleza de su reacción, como previamente se ha descrito. Las diferentes formas que componen la disolución de glutaraldehído reaccionan no sólo con la amoxicilina, sino consigo mismas, generando estructuras complejas. Además, el glutaraldehído puede interactuar en menor grado con otros grupos, como el fenol o el imidazol (Migneault *et al.*, 2004). La elucidación de la estructura se vuelve, por tanto, muy compleja, con una alta probabilidad de presentarse diferentes formas del compuesto, así como dímeros de amoxicilina, entre otros. Esto imposibilitó el conocimiento de la naturaleza del hapteno amoxicilina-glutaraldehído, no pudiéndose determinar su masa molecular ni preparar determinantes antigénicos.

### 4.3 Síntesis del hapteno biotina-amoxicilina y conjugado amoxicilina-estreptavidina.

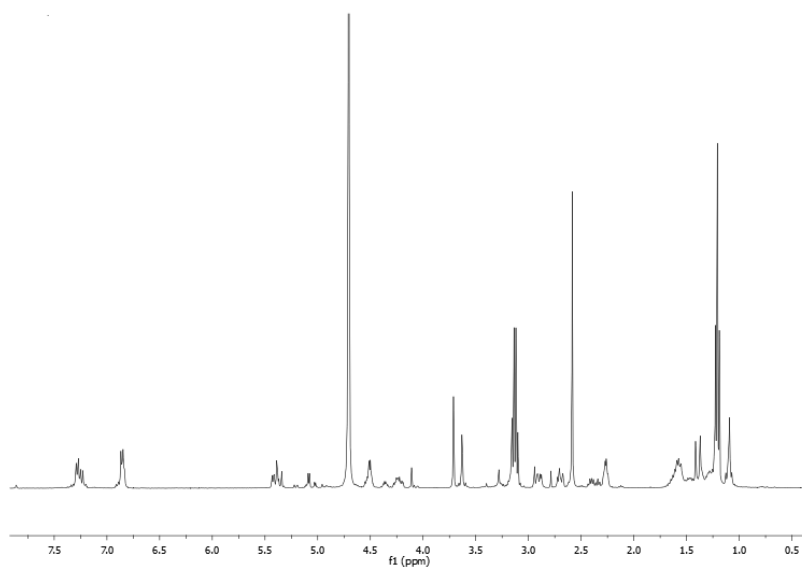
El siguiente abordaje a la síntesis de un hapteno de amoxicilina consistió en la generación de amoxicilina biotinilada, anclándose la biotina a la amoxicilina por la misma amina que en la reacción con el glutaraldehído.

El grupo N-hidroxisuccinimida -NHS- que suele acoplarse a un éster comúnmente llamado éster activo, es capaz de interactuar con las aminas realizando una reacción de intercambio, en la que el éster reacciona con la amina formando un grupo amida. El grupo NHS queda libre como consecuencia de la reacción. El esquema de la reacción se muestra en la figura 19.



**Figura 19.** Esquema de la reacción del NHS éster con un compuesto aminado.

En primer lugar, se realizó la síntesis del hapteno biotinilado siguiendo el método de Ariza et al. (2014) modificado explicado en el apartado métodos. El producto obtenido fue un sólido blanco, del cual se obtuvo el  $^1\text{H}$  NMR del compuesto generado en  $\text{D}_2\text{O}$  (Figura 20).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.37 (d,  $J = 14.2, 5.7$  Hz, 2H), 6.94 (d,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 5.53 – 5.42 (m, 1H), 5.48 (s, 1H), 4.61 (dd,  $J = 11.9, 6.8$  Hz, 1H), 4.47 – 4.26 (m, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.78 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 3.39 – 3.34 (m, 1H), 3.21 (q,  $J = 7.3$  Hz, 3H), 3.05 – 2.93 (m, 1H), 2.69 (s, 2H), 2.35 (t,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 1.72 – 1.60 (m, 2H), 1.51 (s, 1H), 1.45 (s, 1H), 1.29 (t,  $J = 7.3$  Hz, 5H), 1.19 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H).

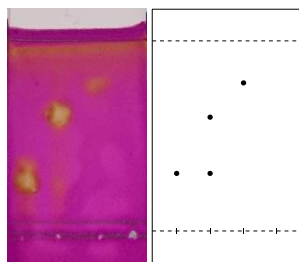


**Figura 20.** Espectro de  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del compuesto de reacción obtenido tras la biotinilación de la amoxicilina.

Tras la obtención del  $^1\text{H}$ -RMN, se concluyó que el compuesto no era completamente puro, apareciendo señales inespecíficas, por ejemplo, en la zona del anillo aromático  $-\delta$  7.37 y 6.94- donde los dobletes no aparecen completamente nítidos, sugiriendo la presencia de amoxicilina libre.

Posteriormente, se realizó una TLC para confirmar visualmente la aparición de un nuevo punto que confirmara la generación de producto. Partiendo de la fase móvil utilizada para el hapteno con glutaraldehído como base, se fueron haciendo modificaciones de la polaridad hasta obtener la separación y migración de todos los compuestos participantes en la reacción. La fase móvil utilizada finalmente fue de acetato de etilo, agua destilada y ácido acético en una relación de volumen 6,5:2:1,5. En este sistema, la polaridad disminuye respecto a la TLC realizada con el determinante de glutaraldehído, aumentando la proporción de ácido acético (Figura 21). La amoxicilina fue el compuesto que menos distancia migró, con una  $R_f$  de 0,3, mientras que la biotina-NHS-éster tuvo una  $R_f$  de 0,78. El producto de reacción mostró un nuevo punto de alta intensidad a una  $R_f$  de 0,6, aunque apareciendo también un punto menos intenso a  $R_f$  de 0,3,

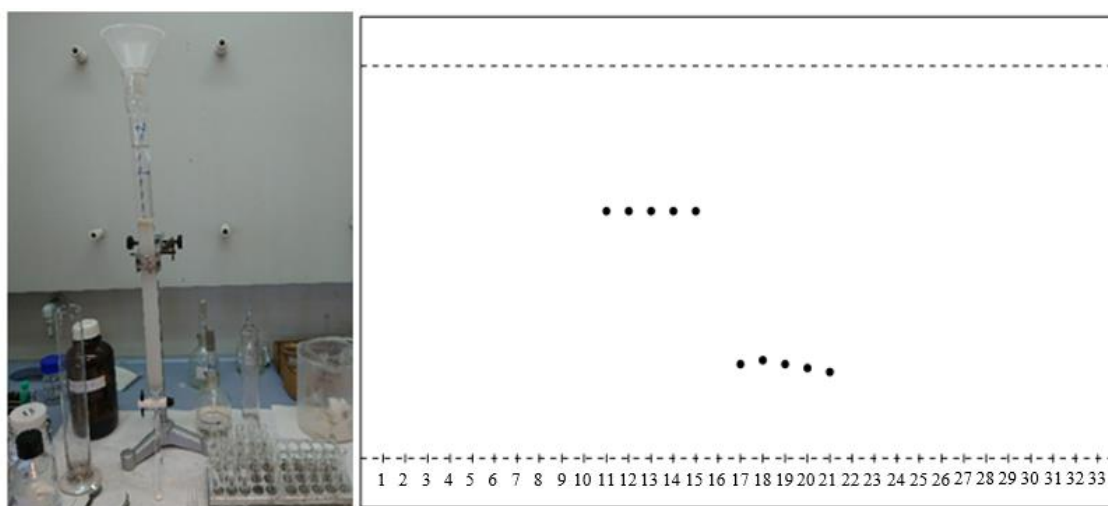
confirmando un exceso de amoxicilina sin reaccionar. La trietilamina no mostró ningún punto, debido probablemente a la volatilización de las aminas de bajo peso molecular en la TLC.



**Figura 21.** A la izquierda se muestra la TLC revelada con KMnO<sub>4</sub> y a la derecha su esquema.

De izquierda a derecha AMX (Rf=0,3), producto (Rf1=0,3; Rf2=0,6), biotina-NHS-Éster (Rf=0,78) y trietilamina (sin punto).

A continuación, se procedió a realizar una cromatografía en columna de gel de sílice, empleando la misma mezcla como fase móvil, a fin de purificar el producto de reacción y eliminar el exceso de amoxicilina. La migración de los compuestos en la cromatografía sigue el mismo patrón que la migración en la TLC, debido a que el gel de sílice no interacciona con ellos. Tras el montaje de la columna, se añadió el producto de reacción en un volumen mínimo de 0,6 mL de metanol, a fin de aumentar la resolución de la separación. Tras la adición del producto, la columna se fue rellenando periódicamente con la fase móvil seleccionada, evitando un secado de la columna. La velocidad de salida fue de 2,5 mL/min, a razón de 4 minutos por tubo de ensayo. En total se rellenaron 33 tubos de ensayo. El contenido de cada tubo se evaluó mediante TLC (Figura 22).



**Figura 22.** Montaje de la columna de gel de sílice. (Derecha) TLC obtenida a partir de los tubos 1-36. Tubos 11-12-13-14-15 Rf=0,63. Tubos 17-18-19-20-21 Rf=0,24 como media.

El producto esperado se encontró en los tubos 11, 12, 13, 14 y 15. Los tubos se vaciaron en un matraz de 250 mL y la fase móvil fue eliminada en rotavapor. Con el producto obtenido -sólido blanco- se realizó una TLC confirmando el Rf de 0,63. La amoxicilina por su parte se encontró de los tubos 17 a 21, con Rfs desde 0,25 a 0,22.

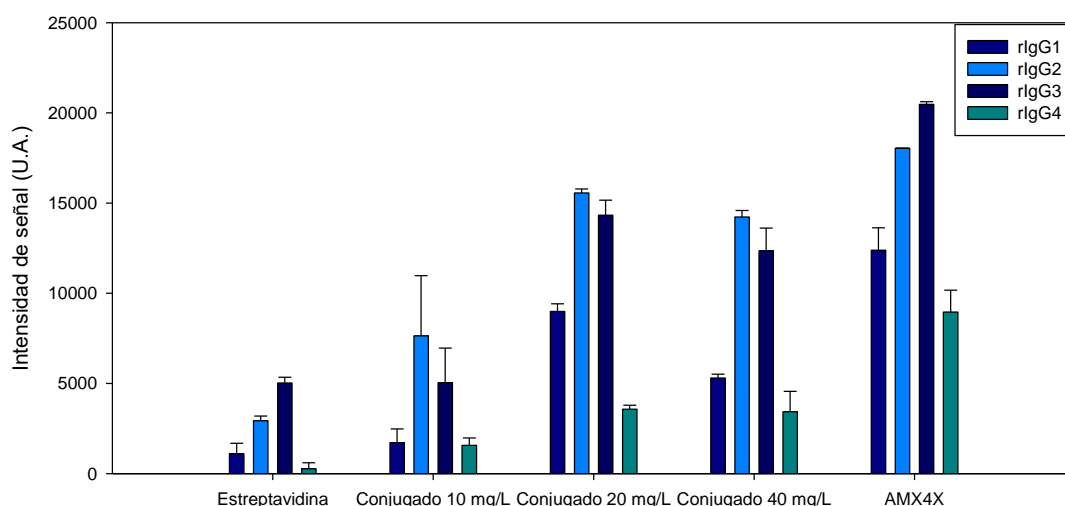
Se procedió entonces a obtener un espectro de  $^1\text{H-RMN}$  de compuesto purificado. Los resultados mostraron el compuesto sufrió una degradación, puesto que el espectro no apareció nítido, mostrando picos con poca resolución. Se concluyó, por tanto, que el producto de reacción se degradó probablemente debido a las condiciones ácidas de la fase móvil.

A pesar de no haber conseguido eliminar totalmente la amoxicilina del producto de reacción, se procedió a conjugarlo con la estreptavidina, en una relación molar 10:1, encontrándose el primero en exceso para asegurar una conjugación completa. Esto se fundamenta en que la amoxicilina libre interacciona con los grupos amino a pH básico para formar el determinante mayor, generalmente a pH 11, mientras que la conjugación se va a llevar a cabo a en PBS a pH 7,4, reduciendo las posibilidades de interacción. Además, por la intensidad del punto observada en la TLC, la amoxicilina libre en el producto de reacción es baja respecto a la amoxicilina biotinilada. Finalmente, la interacción estreptavidina-biotina es una de las interacciones ligando-proteína más fuertes que se encuentran en la naturaleza, dándose de manera rápida y eficaz (Houk *et al.*, 2003).

El conjugado amoxicilina-biotina-estreptavidina se evaluó de la misma forma que los de glutaraldehído, con un inmunoensayo en disco a una concentración de impresión de 10, 20 y 40 mg/L, utilizando rIgG de los cuatro diferentes sueros previamente mencionados. Los resultados se muestran en la figura 23.

Se pudo apreciar que la concentración de impresión que indujo a un mejor reconocimiento por las rIgG fue la de 20 mg/L, por su mayor intensidad de señal. El patrón de reconocimiento de las rIgG fue el mismo que con los conjugados de glutaraldehído, obteniendo señales más altas mediante rIgG2 y rIgG3, mientras que las más bajas fueron las obtenidas por rIgG4.

El conjugado generado por la vía de la biotina obtiene unos valores de señal más intensos que el generado por la estreptavidina sin conjuguar, utilizada como control. Esto es indicativo de su potencial como determinante antigénico, en su futura translación a detección de IgE específica en pacientes. Además, el conjugado impreso a 20 mg/L muestra responde de un modo similar al determinante mayor (AMX4X) para la rIgG2. Para el resto de rIgGs la respuesta fue ligeramente inferior. Esto se podría explicar por el número de lisinas de la proteína carrier del AMX4X respecto al número de sitios activos de unión de biotina en cada molécula de estreptavidina, permitiendo una mayor conjugación y, por tanto, mayor detección.



**Figura 23.** Intensidad de señal obtenida para los conjugados de amoxicilina-biotina-estreptavidina. Dilución de rIgG 1/500.

#### 4.4 Ensayo con suero de paciente.

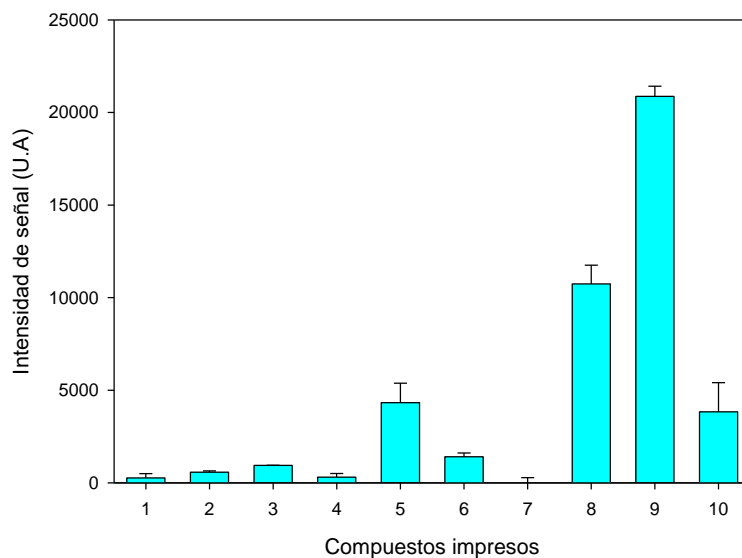
Finalmente, los conjugados preparados se evaluaron mediante el ensayo para la determinación de IgE, utilizando una muestra preparada a partir de tres sueros de pacientes alérgicos a amoxicilina para evaluar un panel final de determinantes antigénicos menores.

Para el ensayo se prepararon dos conjugados más, el primero mediante la ruta del glutaraldehído, con relación molar estreptavidina-amoxicilina 1:160 y 0,5% de glutaraldehído (v/v) siguiendo el mismo método previamente descrito.

El segundo conjugado fue denominado pentaconjugado. Cinco antibióticos diferentes - amoxicilina, penicilina G, aztreonam, meropenem y ceftriaxona -se conjugaron a HSA y P2 por la ruta mayor. Las relaciones molares proteína:antibiótico fueron de 1:60 para la proteína P2 y 1:200 para la HSA, dejando reaccionar durante 4 horas en agitación en tampón carbonato 50 mM a pH 11,0. Se siguió el mismo proceso de filtración y estimación de la concentración que en los conjugados realizados mediante glutaraldehído, obteniendo dos conjugados a 1,0 mg/mL. Los conjugados fueron mezclados en una relación 1:1 en volumen, generando un pentaconjugado doble que combinó dos proteínas diferentes.

La distribución de los reactivos en el array fue la siguiente: (1) Estreptavidina a 40 mg/mL, (2) Conjugado de amoxicilina-biotina-estreptavidina a 20 mg/mL, (3) Conjugado de amoxicilina-glutaraldehído-estreptavidina a 40 mg/mL, (4) HSA a 40 mg/mL, (5) conjugado de referencia AMX4X a 40 mg/mL, (6) Conjugado 13 de glutaraldehído HSA a 40 mg/mL, (7) Conjugado 14 de glutaraldehído HSA a 40 mg/mL, (8) Omalizumab a 20 mg/mL, (9) mIgG a 1 mg/mL y (10) Pentaconjugado a 40 mg/mL. El omalizumab actúa como control de la primera etapa del inmunoensayo, ya que se trata de un IgG1 antiIgE humana, actuando como anticuerpo de

captura. El mIgG controla la tercera etapa, ya que es reconocido por el GAM-HRP. Se realizó el inmunoensayo con una muestra de paciente alérgico a amoxicilina y penicilina G. Los resultados se muestran en la figura 24.



**Figura 24.** Intensidad de señal obtenida para la muestra analizada.

Como se observa en la figura 24, los conjugados preparados en este trabajo no mimetizaron el epítipo responsable de la alergia de estos pacientes, proporcionando una señal similar a la de los controles negativos HSA (barra 4) y estreptavidina (barra 1). Por el contrario, se observó un resultado positivo con el determinante antigénico de referencia (barra 5; AMX4X) y el con el pentaconjugado (barra 10) preparado en este trabajo. Teniendo en cuenta que la muestra con la que se contaba no era muy representativa, no se pueden obtener conclusiones definitivas sobre el inmunoreconocimiento de los conjugados generados por la vía del determinante menor. Por ello, hace falta un estudio más exhaustivo con una cantidad de mayor de muestras de paciente.

## 5 CONCLUSIONES

En este trabajo de fin de grado se han llegado a las siguientes conclusiones:

- Se ha demostrado que la ruta conjugación de la amoxicilina a una proteína por la ruta del glutaraldehído genera un determinante menor que es reconocido por rIgG específicas en el inmunoensayo *in vitro*, obteniendo intensidades de señal más altas que las del conjugado de referencia (AMX4X). Por la propia naturaleza del glutaraldehído, no ha sido posible la caracterización estructural del determinante.
- La síntesis del determinante menor amoxicilina-biotina y su posterior conjugación con la estreptavidina también genera determinantes antigénicos que son reconocidos por las rIgG utilizadas en este estudio.
- La utilización de rIgG específica en ensayos de identificación de epítomos puede ser un modelo exploratorio útil para la selección de determinantes antigénicos. Este modelo de trabajo permite establecer patrones de sensibilización asociados a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en humanos.

En resumen, aún queda mucho trabajo por realizar en el campo de la síntesis de determinantes antigénicos menores que mimeticen el epítomo responsable de la alergia, y contribuir así a un diagnóstico fiable, con altas prestaciones clínicas y analíticas (sensibilidad y especificidad).

Este Trabajo Fin de Grado se ha realizado en el contexto de una beca de Colaboración del Ministerio de Educación. Además, los resultados obtenidos se presentaron en formato poster en el *XIII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition*.



## 6 BIBLIOGRAFÍA

AARNTZEN, E. H. J. G., DE VRIES, I. J. M., GÖERTZ, J. H., BELDHUIS-VALKIS, M., BROUWERS, H. M. L. M., VAN DE RAKT, M. W. M. M., VAN DER MOLEN, R. G., PUNT, C. J. A., ADEMA, G. J., TACKEN, P. J., JOOSTEN, I., JACOBS, J. F. M. (2012). Humoral anti-KLH responses in cancer patients treated with dendritic cell-based immunotherapy are dictated by different vaccination parameters. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(11), 2003–2011.

ABRAHAM, E. P., Y CHAIN, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin [1]. *Nature*, 146(3713), 837.

ACTOR, J. K. (2012). *Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology*. Segunda edición. W.B. Saunders. Philadelphia. 192 pp.

ALHARBI, S. A., WAINWRIGHT, M., ALAHMADI, T. A., SALLEEH, H. BIN, FADEN, A. A., Y CHINNATHAMBI, A. (2014). What if Fleming had not discovered penicillin? *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(4), 289–293.

AMINOV, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1, 134.

ARIZA, A., COLLADO, D., VIDA, Y., MONTAÑEZ, M. I., PÉREZ-INESTROSA, E., BLANCA, M., TORRES, MJ., CAÑADA, FJ., PÉREZ-SALA, D. (2014). Study of protein haptentation by amoxicillin through the use of a biotinylated antibiotic. *PLOS ONE*, 9(3), 1–12.

ARIZA, A., MAYORGA, C., FERNANDEZ, TD., BARBERO, N., MARTÍN-SERRANO, A., PÉREZ-SALA, D., SÁNCHEZ-GÓMEZ, FJ., BLANCA, M., TORRES, MJ. & MONTAÑEZ MI. (2015). Hypersensitivity reactions to s-lactams: Relevance of haptent-protein conjugates. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 25(1), 12–25.

BALDO, B., ZHAO, Z. Y PHAM, N. (2001). Structural determinants of antibiotic allergy. *Current Allergy Reports*, 1(1), 23–31.

BASSETT, E. J., KEITH, M. S., ARMELAGOS, G. J., MARTIN, D. L., Y VILLANUEVA, A. R. (1980). Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science*, 209(4464), 1532-1534.

BHATTACHARYYA, P. K., Y CORT, W. M. (1978). Amoxicillin. In *Analytical Profiles of Drug Substances*, 7, 19–41.

BLANCA, M., MAYORGA, C., TORRES, M. J., RECHE, M., MOYA, C., RODRIGUEZ, J. L., ROMANO, A., JUAREZ, C. (2001). Clinical evaluation of Pharmacia CAP System™ RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 56(9), 862–870.

BONDARUK, J., Y SCHNEIDER, CH. (1995). Basic aspects related to penicillin-allergy skin testing on the variability of the haptent-paratope interaction. *Allergy*, 50(8), 671-676.

DOÑA, I., TORRES, M. J., MONTAÑEZ, M. I., & FERNÁNDEZ, T.D. (2017). In vitro diagnostic testing for antibiotic allergy. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 9(4), 288–298.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. (2018). *Antimicrobial consumption. ECDC. Annual Epidemiological Report for 2017*. Estocolmo. 23 pp.

FUJIWARA, K., MURATA, I., YAGISAWA, S., TANABE, T., YABUCHI, M., SAKAKIBARA, R., Y TSURU, D. (1999). Glutaraldehyde (GA)-hapten adducts, but without a carrier protein, for use in a specificity study on an antibody against a GA-conjugated hapten compound: Histamine monoclonal antibody (AHA-2) as a model. *Journal of Biochemistry*, 126(6), 1170–1174.

GADDE, J., SPENCE, M., WHEELER, B., Y ADKINSON, N. F. (1993). Clinical Experience With Penicillin Skin Testing in a Large Inner-City STD Clinic. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 270(20):2456-2463.

GOMES, E. R., & DEMOLY, P. (2005). Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 5(4):309-316.

GOOSSENS, H., FERRECH, M., VANDER STICHELE, R., Y ELSEVIERS, M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: A cross-national database study. *Lancet*, 365(9459), 579-587.

GUMUSTAS, M., SENDEL-TURK, C. T., Y GUMUSTAS, A. (2017). Effect of polymer-based nanoparticles on the assay of antimicrobial drug delivery systems, en *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*. Elsevier. Amsterdam, 67-108.

HERMANSON, G. T. (2013). *Bioconjugate Techniques*. Tercera Edición. Academic Press. Cambridge, Massachusetts. 1200 pp.

HOUK, K. N., LEACH, A. G., KIM, S. P., Y ZHANG, X. (2003). Binding Affinities of Host-Guest, Protein-Ligand, and Protein-Transition-State Complexes. *Angewandte Chemie - International Edition*, 42(40), 4872–4897.

KARAMAN, R. (2015). From Conventional Prodrugs to Prodrugs Designed by Molecular Orbital Methods, en: *Frontiers in Computational Chemistry*. Bentham Science Publishers. Sarja, 187-249.

KILDEEVA, N. R., PERMINOV, P. A., VLADIMIROV, L. V., NOVIKOV, V. V., Y MIKHAILOV, S. N. (2009). About Mechanism of Chitosan Cross-Linking with Glutaraldehyde. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35(3), 360–369.

LAXMINARAYAN, R., DUSE, A., WATTAL, C., ZAIDI, A. K. M., WERTHEIM, H. F. L., SUMPRADIT, N., Vlieghe, E., HARA, G. L., GOULD, I. M., GOOSSENS, H., GREKO, C.,

SO, A. D., BIGDELI, M., TOMSON, G., WOODHOUSE, W., OMBAKA, E., PERALTA, A. Q., QAMAR, F. N., MIR, F., KARIUKI, S., BHUTTA, Z. A., COATES, A., BERGSTROM, R., WRIGHT, G. D., BROWN, E. D., CARS, O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057-98

MAYORGA, C., DOÑA, I., PEREZ-INESTROSA, E., FERNÁNDEZ, T. D., Y TORRES, M. J. (2017). The value of in vitro tests to diminish drug challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1222.

MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M. J., Y WALDRON, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790–796, 798–802.

MORAIS, S., PUCHADES, R., Y MAQUIEIRA, Á. (2016). Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(17), 4523–4534.

NEU, H. C. (1985) 'Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity', *The American Journal of Medicine*, 79(2A), 2-13.

TORRES, M. J., ARIZA, A., FERNÁNDEZ, J., MORENO, E., LAGUNA, J. J., MONTAÑEZ, M. I., RUIZ-SANCHEZ, A. J., BLANCA, M. (2010). Role of minor determinants of amoxicillin in the diagnosis of immediate allergic reactions to amoxicillin. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 65(5), 590–596.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017). The Selection and Use of Essential Medicines: Report of the WHO Expert Committee, 2017 (Including the 20th WHO Model List of Essential Medicines and the 6th WHO Model List of Essential Medicines for Children). *WHO technical report series 1006*. Italia. 604 pp.