

Alrededor del 10 % de las reacciones adversas a medicamentos son debidas a alergias, siendo los antibióticos β -lactámicos los que más episodios alérgicos ocasionan. Aunque la incidencia real sigue siendo desconocida, los individuos sospechosos de presentar alergia a algún medicamento acaban siendo prescritos con otros medicamentos, menos efectivos, más caros o perjudiciales. Así pues, un correcto diagnóstico resulta clave para disminuir los costes económicos derivados y proceder a un adecuado 'desetiquetado' de la población. En la actualidad, las pruebas de diagnóstico de alergias a antibióticos β -lactámicos se basan en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Estos ensayos muestran bajas prestaciones, ya que son invasivos y peligrosos y proporcionan falsos positivos y/o negativos. Además, la sensibilidad diagnóstica está lejos de ser la esperada, posiblemente porque aún no se ha conseguido reconocer todos los epítomos causantes de los episodios alérgicos. En este sentido, la preparación de antígenos se ha basado hasta el momento, en mayor medida, en la unión directa de los antibióticos a las moléculas portadoras mediante la formación de un enlace amida entre los grupos amino de las lisinas de la molécula portadora y el grupo carboxilato del antibiótico. Aun así, las IgE específicas son vagamente detectadas con estos antígenos.

En esta tesis se ha abordado la síntesis de haptenos y la generación de determinantes antigénicos a antibióticos β -lactámicos con los que poder realizar un diagnóstico *in vitro* más fiable de alergias a estos fármacos. La evaluación de los mismos se ha llevado a cabo mediante ensayos *in vitro* multiplex basados en tecnología de disco compacto.

Esta investigación comienza centrándose en la síntesis y preparación de antígenos de penicilina. Para ello, en una primera fase se ha estudiado el efecto de la incorporación de brazos espaciadores alifáticos en la generación de antígenos, considerando la posibilidad de que se obtenga un mejor reconocimiento molecular al alejar el hapteno de la proteína portadora. Se sintetizaron trece haptenos derivados de bencilpenicilina y amoxicilina con los que se prepararon antígenos con la proteína albumina de suero humano. La evaluación de los antígenos reveló que a pesar de ser suficientemente inmunogénicos y ser reconocidos por anticuerpos IgG de conejo, éstos no fueron reconocidos por IgE específicas de muestras de pacientes alérgicos. Así bien, por otro lado, la estrategia de cationización de las proteínas albumina de suero humano e histona fue abordada teniendo en cuenta que la modificación de grupos carboxilatos de la proteína a grupos amino aumenta la relación molar hapteno/proteína. Esta estrategia permitió la generación de 5 antígenos, 4 de los cuales (los antígenos de histona), esta vez sí, incrementaron la especificidad de la respuesta inmunológica obtenida, reconociendo IgE específicas. Concretamente, se han determinado IgE específicas en suero de pacientes alérgicos a bajas concentraciones (LOD = 0.07 IU/mL) con una especificidad diagnóstica del 100 % y una sensibilidad del 60 y 31 % para bencilpenicilina y amoxicilina, respectivamente, mejorando la sensibilidad un 60 % en comparación con el ensayo *in vitro* de referencia.

A continuación, se abordó la idea de preparar antígenos menores basados en metabolitos de penicilina. Así pues, los ácidos peniciloico, peniloico, penicílico y 6-aminopenicilánico, junto con la penicilamina fueron conjugados a las proteínas albumina de suero humano e histona. Su evaluación mediante el ensayo *in vitro* mostró que todos, excepto el ácido peniloico, fueron reconocidos específicamente y selectivamente al analizar un conjunto de muestras de suero de pacientes positivos. La especificidad diagnóstica obtenida fue del 100 %, 94 % en el caso del ácido penicílico, y la sensibilidad se situó entre el 67 y 100 %.

Evaluada la preparación de antígenos de penicilina, la tesis se centró en la producción de antígenos para otras familias de antibióticos β -lactámicos. La generación de antígenos para las cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas o los inhibidores β -lactámicos resulta

imprescindible, ya que no se encuentran actualmente en el mercado ensayos *in vitro* para la detección de alergias a estos antibióticos. Así bien, en primer lugar, se evaluaron los resultados obtenidos tras la preparación de antígenos mayoritarios y minoritarios para los antibióticos cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, meropenem y aztreonam. Mientras los antígenos mayores no fueron reconocidos al analizar muestras de suero de pacientes, los menores sí. La utilización de estos antígenos menores, preparados tras la acidificación de sus correspondientes sales, mejoró las prestaciones analíticas del microinmunoensayo desarrollado. Así, se obtuvieron altos niveles de sensibilidad analítica (LOD < 0.01 IU/mL) y especificidad diagnóstica (100 %). Finalmente, se obtuvieron valores de sensibilidad diagnóstica del 35, 49 y 51 % para los antibióticos cefuroxima, cefotaxima y meropenem.

A continuación, el trabajo se orientó a la preparación de antígenos del ácido clavulánico ya que la combinación del mismo con amoxicilina, comúnmente conocido como Augmentin, es hoy en día el medicamento más prescrito. Hasta lo que se conoce, no existe un ensayo *in vitro* para la determinación de IgE específica de ácido clavulánico, por lo que resulta muy interesante abordar la síntesis de haptenos. En este caso, se sintetizaron tres haptenos derivados del ácido clavulánico y se conjugaron a las proteínas albumina de suero humano, histona y a la proteína inmunogénica hemocianina de lapa californiana. Los resultados obtenidos revelaron la importancia de la estructura química ya que dos de estos haptenos generaron anticuerpos tipo IgG con una elevada selectividad al ácido clavulánico. Concretamente, la selectividad fue tres veces mayor (la reactividad cruzada pasó del 30 al 10 %) que para otras familias de antibióticos β -lactámicos. Finalmente, solo el antígeno conjugado a albumina de suero humano preparado tras la esterificación del clavulanato potásico permitió la detección de IgE específica de pacientes alérgicos. Así pues, la sensibilidad diagnóstica obtenida en el ensayo fue del 50 % y la especificidad diagnóstica del 100 %.

A pesar de las mejoras obtenidas con las estrategias llevadas a cabo, se estudiaron otras vías no clásicas para la síntesis de nuevos haptenos con mayor diversidad química. Este enfoque se basa en la generación de antígenos en librerías químicas de compuestos con diversidad estructural para encontrar nuevos haptenos biológicamente activos. Dichas estrategias, hasta el momento, no han sido empleadas para la generación de antígenos y el análisis de muestras de suero de pacientes alérgicos. Con el fin de incorporar diversidad estructural, se sintetizaron, mediante la técnica combinatoria *diversity-oriented synthesis*, 22 compuestos de los precursores de las penicilinas y cefalosporinas, ácido 6-aminopenicilánico y ácido 7-amino-desacetoxicefalosporánico, respectivamente, y los antibióticos amoxicilina y ampicilina. Su evaluación con el inmunoensayo *in vitro* basado en disco compacto ha demostrado que la incorporación de diversidad permite el reconocimiento de epítomos causantes de episodios alérgicos. Concretamente, se observó que estos antígenos eran capaces de detectar anticuerpos tipo IgG e IgE específicos procedentes de suero de conejos inmunizados y de suero humano de pacientes alérgicos, siendo especialmente selectivos los determinantes de amoxicilina y ampicilina. Concretamente, se obtuvo una sensibilidad diagnóstica del 79 % y una especificidad diagnóstica del 100 %.