ANTICUERPO CONTRA LA PROTEÍNA BLO T 21 DE BLOMIA TROPICALIS Y KITS QUE LO CONTIENEN

CAMPO TÉCNICO

El presente desarrollo está relacionado con el campo de la biotecnología, particularmente con kits para detección y cuantificación de alergenos, y más particularmente con kits para cuantificar la proteína alergénica Blo t 21 de *Blomia tropicalis*.

ANTECEDENTES

Las enfermedades alérgicas son uno de los problemas de salud pública de mayor prevalencia alrededor del mundo, afectando a millones de personas de diferentes edades y etnias, y generando en consecuencia un impacto negativo en la economía de diversos países, especialmente aquellos en vía de desarrollo. Uno de los agentes etiológicos responsables de estas patologías corresponde a los alergenos derivados de los ácaros del polvo domésticos, los cuales son capaces de generar una reacción inmunológica adversa en el paciente, desencadenando diferentes síntomas que disminuyen su calidad de vida.

En la actualidad, el manejo de los síntomas asociados con alergia a los ácaros incluye el tratamiento con extracto completo del organismo en cuestión. No obstante, existe una gran variabilidad en los resultados generados por esta metodología, lo cual se atribuye en parte a que la composición de los extractos puede diferir dependiendo del método utilizado para su obtención, la fuente a partir de la cual se deriva el extracto, y la solubilidad de las proteínas responsables de generar la reacción alérgica.

Lo anterior es de especial importancia en el caso de los alergenos derivados de *Blomia tropicalis*, uno de los ácaros más comunes en las zonas tropicales y subtropicales del planeta. En particular, este ácaro presenta una gran variedad de proteínas alergénicas diferentes (comúnmente denominadas proteínas Blo t), algunas de las cuales tienen un mayor potencial de generar una reacción alérgica en un individuo - y por lo tanto tienen una mayor relevancia clínica - pero que se encuentran en menor proporción en los extractos completos. Tal es el caso de la proteína Blo t 21, una proteína de 13 kDa localizada principalmente en el intestino de *B. tropicalis*, cuyo potencial alergénico ha

sido demostrado en estudios previos, pero que generalmente se encuentra en una proporción menor al 9% en extractos completos (da Silva, E.S., *et al*. 2019. Proteomic analysis reveals allergen variability among breeds of the dust mite *Blomia tropicalis*. International Archives of Allergy and Immunology; 180(3): 159-172).

En vista de lo anterior, existe la necesidad de desarrollar una metodología que facilite la detección de la proteína Blo t 21 en los extractos completos de *B. tropicalis*, la cual permita posteriormente la estandarización del contenido relativo de los alergenos más relevantes en dichos extractos.

BREVE DESCRIPCIÓN

El presente desarrollo está dirigido a un kit para cuantificar la proteína Blo t 21 de *Blomia tropicalis* en una muestra, en donde el kit comprende (a) un elemento de soporte; (b) una proteína Blo t 21 recombinante; (c) un anticuerpo primario que se une a Blo t 21; y (d) un anticuerpo secundario unido a una etiqueta, en donde el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método *in vitro* para cuantificar la proteína Blo t 21 de *Blomia tropicalis* en una muestra, que comprende (a) agregar la muestra al elemento de soporte del kit de cuantificación de Blo t 21; (b) agregar un anticuerpo primario que se une a Blo t 21; (c) agregar un anticuerpo secundario unido a una etiqueta; (d) incubar la mezcla generada en (c); y (e) cuantificar la proteína Blo t 21 mediante espectrofotometría, colorimetría, fluorometría o luminometría.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Diagrama general de los pasos seguidos en el método de detección y cuantificación de Blo t 21 con el kit de cuantificación de Blo t 21.

FIG. 2 ELISA con dos anticuerpos monoclonales anti-Blo t 21 biotinilados, con Blo t 21 recombinante en fase sólida. Los anticuerpos se analizaron a las concentraciones de 1, 0,1 y 0,01 µg/ml. El eje Y corresponde a los niveles de Blo t 21 detectados y registrados en valores de densidad óptica (OD).

FIG. 3 Western blot con sobrenadantes de clonas parentales de hibridoma del anticuerpo monoclonal 19E7. MW - Marcador de peso molecular; Carriles 1 a 8 - Reactividad de diferentes clonas productoras de anticuerpos anti Blo t 21; Carril 9 - Reactividad de clona 19E7B.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Kit de cuantificación

En un primer aspecto, el presente desarrollo comprende un kit para cuantificar la proteína Blo t 21 de *B. tropicalis* en una muestra, en donde el kit comprende: (a) un elemento de soporte; (b) una proteína Blo t 21 recombinante; (c) un anticuerpo primario que se une a Blo t 21; y (d) un anticuerpo secundario unido a una etiqueta, en donde el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario.

En el contexto de la presente divulgación, un "*elemento de soporte*" corresponde a una superficie sólida que permite la adsorción e inmovilización estructurada en presencia de solución tamponada a pH apropiado de alguna de las moléculas involucradas en la detección y cuantificación, ya sean las proteínas de la muestra o los anticuerpos involucrados en la detección. Este proceso permite que las moléculas adsorbidas queden expuestas para interactuar específicamente con el ligando correspondiente. En modalidades particulares, el elemento de soporte se selecciona entre una superficie de vidrio, papel, silicio, nitrocelulosa, oro, plata y poliestireno. En modalidades particulares, el elemento de soporte corresponde a poliestireno. En modalidades aún más particulares, el elemento de soporte corresponde a una placa de microtitulación de poliestireno.

El kit de cuantificación comprende una proteína Blo t 21, la cual se utiliza para la elaboración del control positivo y para la generación de la curva de calibración. La proteína Blo t 21 del kit aquí descrito comprende la proteína de longitud completa, así como cualquier fragmento antigénico de la misma, en donde dicho fragmento antigénico comprende al menos un epítopo continuo o discontinuo de Blo t 21 capaz de generar una respuesta inmune en un individuo. En modalidades particulares, la proteína Blo t 21 corresponde a una proteína Blo t 21 recombinante.

Para efectos de la presente invención, el término "*anticuerpo*" hace referencia a una molécula de inmunoglobulina (Ig) que tiene la capacidad de unirse de forma específica a una diana (denominada técnicamente antígeno) mediante uno o más sitios de reconocimiento específicos para dicha diana, en donde dichos sitios de reconocimiento se localizan en la región variable del anticuerpo. Tal como entenderá la persona versada en la materia, la unión específica de un anticuerpo al antígeno no implica necesariamente que dicho anticuerpo se una de manera exclusiva a dicho antígeno. De este modo, la referencia a la unión específica busca indicar generalmente una unión preferencial a una diana particular.

Los anticuerpos están conformados por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, las cuales se encuentran interconectadas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada y cada cadena ligera de un anticuerpo comprende una región variable (V_H / V_L) y una región constante (C_H / C_L). A su vez, cada región V_H y V_H está conformada por cuatro regiones marco (FR) intercaladas entre tres regiones hipervariables, también conocidas como regiones determinantes de complementariedad (CDR). En conjunto, estas CDR contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Tal como entenderá la persona versada en la materia, las CDR de cualquier anticuerpo pueden identificarse mediante diferentes metodologías de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia, la acumulación de definiciones de Kabat y Chothia, definiciones de AbM, contacto, y/o conformacionales o cualquier otro método de determinación de CDRs conocido en el campo técnico.

En una modalidad particular, el anticuerpo primario (también denominado primer anticuerpo) corresponde a un anticuerpo que se une a la proteína Blo t 21 de *B. tropicalis*. En modalidades más particulares, el anticuerpo primario comprende una CDR 1 de V_H (V_H-CDR1) de SEQ ID NO: 1 o 2, una V_H-CDR2 de SEQ ID NO: 3 o 4 y una V_H-CDR3 de SEQ ID NO: 5 o 6; así como una CDR1 V_L (V_L-CDR1) de SEQ ID NO: 7, una V_L-CDR2 de SEQ ID NO: 8 y una V_L-CDR3 de SEQ ID NO: 9. En otra modalidad, el presente desarrollo hace referencia a un anticuerpo anti-Blo t 21 que comprende una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 u 11; y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

El kit de cuantificación comprende además un segundo anticuerpo o "*anticuerpo secundario*" que se une al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario puede ser obtenido por la persona versada en la materia mediante métodos ampliamente conocidos en el campo técnico.

El anticuerpo secundario puede marcarse directa o indirectamente (*v.g.* a través de un grupo conector) con etiquetas apropiadas para su posterior detección por medio de métodos químicos, bioquímicos, espectroscópicos, entre otros. Dependiendo de la metodología de detección a utilizar, las etiquetas para marcar el anticuerpo pueden seleccionarse de manera no limitativa entre fluoróforos como fluoresceína, rodamina y eosina; radionúclidos como azufre-35, fluor-18, y iodo- 131; enzimas como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, β-galactosidasa y luciferasa; y grupos prostéticos como estreptavidina, avidina y biotina; entre otros. Métodos para realizar el marcaje o etiquetado de anticuerpos pueden encontrarse en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, *et al*. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición. Cold Spring Harbor Press).

En modalidades particulares, el presente desarrollo comprende además un "*sustrato de cuantificación*", el cual corresponde a un compuesto que interactúa con la etiqueta presente en el anticuerpo primario o secundario para producir una señal detectable. Por ejemplo, cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima, como un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable. En modalidades particulares, dicho sustrato de cuantificación se selecciona de forma no limitativa entre 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-fenilenediamina (OPD), 2,2'-azino-di[3-etil-benzotiazolin] sulfonato (ABTS), luminol, polifenoles, ésteres de acridina, luciferina o una combinación de los mismos.

En algunas modalidades, el sustrato de cuantificación y/o los anticuerpos utilizados en el kit de cuantificación aquí descrito pueden proporcionarse en una o varias soluciones líquidas, preferiblemente en una solución acuosa estéril. En otras modalidades, los componentes del kit también pueden facilitarse en forma de sólidos (*v.g.* liofilizados) y pueden convertirse en líquidos añadiendo los disolventes adecuados.

El kit descrito en la presente divulgación corresponde, a la fecha, al único producto descrito en el arte dirigido a la cuantificación de la proteína Blo t 21 de *B. tropicalis*. El kit descrito en la presente divulgación tiene utilidad entre otros aspectos, sin limitarse al control de calidad en el proceso de fabricación de vacunas y productos farmacéuticos relacionados, especialmente aquellos basados en esta especie de ácaro. De otra parte, la cuantificación de Blo t 21 con el kit descrito también permite medir factores de riesgo y diseñar medidas de control preventivo en regiones donde *B. tropicalis* es prevalente, siendo así de valor en la práctica clínica para un mejor manejo de las alergias causadas por ácaros domésticos.

Métodos de cuantificación

Otro aspecto del presente desarrollo comprende un método *in vitro* para cuantificar la proteína Blo t 21 de *B. tropicalis* en una muestra mediante el kit de cuantificación aquí descrito. En particular, este método comprende en primer lugar poner en contacto una muestra con el anticuerpo primario en el elemento de soporte del kit. La interacción entre este primer anticuerpo con la proteína Blo t 21 presente en la muestra da lugar a la formación de un complejo anticuerpo-proteína. Posteriormente, se añade el anticuerpo secundario a la mezcla, en donde dicho anticuerpo secundario se une al complejo antes mencionado. Una vez ocurre esta interacción, se puede añadir un sustrato de cuantificación, que permite la cuantificación de la proteína Blo t 21 mediante la generación de una señal detectable al entrar en contacto con la enzima unida al segundo anticuerpo, en donde la intensidad de la señal (detectada mediante espectrofotometría, colorimetría, fluorometría, luminometría o cualquier metodología apropiada conocida en el campo técnico) es directamente proporcional a la concentración de la proteína Blo t 21 presente en la muestra analizada, por extrapolación a una curva estándar.

En algunas modalidades, una vez se agregan todos los componentes al kit anteriormente referidos, la reacción se somete a incubación en condiciones apropiadas para permitir la interacción del anticuerpo con el antígeno, así como la generación de la señal detectable. En algunas modalidades, esta etapa de incubación tiene una duración entre 5 y 30 minutos. En modalidades particulares, la incubación se realiza a una temperatura entre 20 y 35 °C.

Las muestras que pueden ser evaluadas con el kit de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a extractos alergénicos derivados de ácaros domésticos en proceso de producción o terminados; presentaciones farmacéuticas tipo vacunas para las alergias a los ácaros, y muestras de polvo casero o ambiental.

En una modalidad particular del desarrollo, la cuantificación se puede realizar a partir de un volumen de muestra entre 5 y 20 µL. En otra modalidad particular, la muestra puede ser diluida en un factor de 10, 50 o 100 para facilitar la cuantificación. En modalidades particulares, el diluyente empleado para diluir la muestra se selecciona de manera no limitativa entre solución salina, agua purificada y tampón de fosfato.

La sensibilidad del método *in vitro* de cuantificación aquí descrito varía dependiendo de la metodología de detección empleada. En el caso de la detección por espectrofotometría, en donde la absorbancia (densidad óptica) de la muestra es medida a una longitud de onda entre 400 nm y 460 nm, el método de cuantificación tiene un límite de detección entre 0,022 y 2,5 µg/ml, con un coeficiente de variación de 6,8%. La aplicación de este desarrollo para la detección del alergeno Blo t 21 mediante espectrofotometría se ilustra de forma general en la Figura 1.

EJEMPLOS

El desarrollo tecnológico se presenta en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

Ejemplo 1. Detección de Reactividad del Anticuerpo Monoclonal 19ET con Blo t 21 mediante ELISA

Para la detección por medio de ELISA, se transfirieron mezclas de 0; 0,008; 0,04; 0,2; 1,0; y 5,0 µg/ml de la proteína Blo t 21 en buffer carbonato/bicarbonato a una microplaca de 96-pozos, la cual fue incubada en cámara húmeda a 4 °C por 16 a 18 horas. Posteriormente, se realizaron lavados de los pozos con PBS-Tween 20 0,1%, y se agregaron 200 µL de buffer de bloqueo a cada pozo, para luego incubar por 90 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego de esto, se realizaron lavados con

PBS-Tween 20 al 0,1%, se adicionaron 100 µL/pozo del anticuerpo primario anti-Blo t 21 19ET (Tabla 1) o 4D11 y se incubó la placa en cámara húmeda 2 horas a temperatura ambiente. Una vez terminó este periodo, se realizaron nuevamente lavados con PBS-Tween 20 al 0,1% y se agregaron 100 µL de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón-biotina diluido 1:1000 en buffer conjugado a cada pozo y se incubó durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posterior a varios lavados con PBS-Tween 20 al 0,1%, se agregaron a cada pozo 100 µL de Extravidina/Fosfatasa alcalina diluida en buffer conjugado y se incubó por 1 hora en cámara húmeda a 37 °C. Después de varios lavados con PBS-T, se agregaron 100 µL de pNPP 1 mg/ml en dietanolamina / $MgCl_2$, se incubó en cámara oscura a temperatura ambiente por 30 minutos y se agregó NaOH 3N para detener la reacción. La densidad óptica a 405 nm fue leída en un espectrofotómetro.

Como se observa en la Figura 2, los dos anticuerpos evaluados permitieron detectar y cuantificar la proteína Blo t 21 en las diferentes muestras ensayadas.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos del anticuerpo 19ET

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	VH_1-CDR1	RYSVH
2	VH_2-CDR1	DYYMY
3	VH_1-CDR2	MIWGGGSTDYNSALKS
4	VH_2-CDR2	TISDGGSYTYYPDSVKG
5	VH_1-CDR3	YAMDY
6	VH_2-CDR3	DDSLLSLFFAY
7	VL-CDR1	RASQDISNYLN

8	VL-CDR2	YTSRLHS
9	VL-CDR3	QQGNTLPWT
10	VH_1	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLSRYSV HWVRQPPGKGLEWLGMIWGGGSTDYNSALKS RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR YAMDYWGQGTSVTVSS
11	VH_2	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDY YMYWVRQTPEKRLEWVATISDGGSYTYYPDS VKGRFTISRDNAKNNLYLQMSSLKSEDTAMYY CARDDSLLSLFFAYWGQGTLVTVSA
12	VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLN WYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGG GTKLEIK

Ejemplo 2. Detección de Reactividad del Anticuerpo Monoclonal 19ET con Blo t 21 mediante Inmunoblot

A partir de extractos alergénicos de *B. tropicalis*, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida para separar las proteínas allí contenidas. Posteriormente, se transfirieron los productos de electroforesis por vía húmeda a una membrana de nitrocelulosa usando la cámara Mini Trans-Blot Cell (Cat. #1703930, Bio-Rad) en buffer de electrotransferencia (Tris 25 mM/glicina 192 mM/ metanol 20% v/v) durante 1 hora y 30 minutos a 180 mA. Después de confirmar la transferencia mediante tinción con rojo Ponceau y lavado, se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas con solución salina de buffer fosfato (PBS) 0,1 M/Tween 20 al 0,1%/leche descremada 5% durante 45 minutos. Después de lavados con PBS/Tween 20 al 0,1 % y PBS 0,1 M (pH 7,4), la membrana se incubó por 16 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo 19ET. Después de lavados con PBS/Tween 20 al 0,1% y con PBS 0,1 M por 10 minutos, se incubó la membrana con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina diluida 1:500 en PBS/Tween 20 al 0,1 % por tres horas, y posteriormente se realizaron cuatro lavados con buffer NaCl 150 mM/Tris-HCl 5 mM pH 7,5. Para el revelado, se adicionó el sustrato

NBT y BCIP en buffer de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM/NaCl 150 mM/$MgCl_2$ 1 mM, pH 9,5), y la reacción se detuvo agregando agua.

Tal como se observa en la Figura 3, la metodología diseñada permitió la detección y cuantificación de la proteína Blo t 21 en las muestras evaluadas.

REIVINDICACIONES

1. Un kit para cuantificar la proteína Blo t 21 de *Blomia tropicalis* en una muestra, en donde el kit comprende:

(a) un elemento de soporte;

(b) una proteína Blo t 21 recombinante;

(c) un anticuerpo primario que se une a Blo t 21; y

(d) un anticuerpo secundario unido a una etiqueta;

en donde el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario.

2. El kit de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el elemento de soporte se selecciona entre una superficie de vidrio, papel, silicio, nitrocelulosa, oro, plata, poliestireno y grafeno.

3. El kit de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el primer anticuerpo comprende una V_H-CDR1 de SEQ ID NO: 1 o 2, una V_H-CDR2 de SEQ ID NO: 3 o 4 y una V_H-CDR3 de SEQ ID NO: 5 o 6; y una V_L-CDR1 de SEQ ID NO: 7, una V_L-CDR2 de SEQ ID NO: 8 y una V_L-CDR3 de SEQ ID NO: 9.

4. El kit de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la etiqueta unida al anticuerpo secundario corresponde a una enzima que se selecciona entre peroxidasa de rábano (HRP) y fosfatasa alcalina.

5. El kit de acuerdo con la Reivindicación 4, que comprende además un sustrato de cuantificación que se selecciona entre 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-fenilenediamina (OPD), 2,2'-azino-di[3-etil-benzotiazolin] sulfonato (ABTS), luminol, polifenoles, ésteres de acridina y luciferina.

6. Un método *in vitro* para cuantificar la proteína Blo t 21 de *Blomia tropicalis* en una muestra, que comprende:

a) agregar la muestra al elemento de soporte del kit de la Reivindicación 1;

b) adicionar un anticuerpo primario que se une a Blo t 21;

c) agregar un anticuerpo secundario unido a una etiqueta;

d) incubar la mezcla obtenida en c); y

e) cuantificar la proteína Blo t 21 mediante espectrofotometría, colorimetría, fluorometría o luminometría.

7. El método *in vitro* de acuerdo con la Reivindicación 6, en donde la muestra se selecciona entre extractos alergénicos; vacunas anti-alergénicas y muestras de polvo.

8. El método *in vitro* de acuerdo con la Reivindicación 6, que comprende además adicionar un sustrato de cuantificación para generar una señal detectable luego de la etapa c).

****

RESUMEN

El desarrollo se refiere a anticuerpos que se unen a la proteína Blo t 21 del ácaro *Blomia tropicalis*, uno de los alérgenos de mayor importancia clínica en regiones tropicales y subtropicales, así como a un kit para detectar dicha proteína en una muestra de forma rápida y eficiente. En particular, el kit desarrollado facilita el control de calidad de los extractos alergénicos de *B. tropicalis* que se emplean para diagnóstico e inmunoterapia de enfermedades respiratorias, tales como el asma.

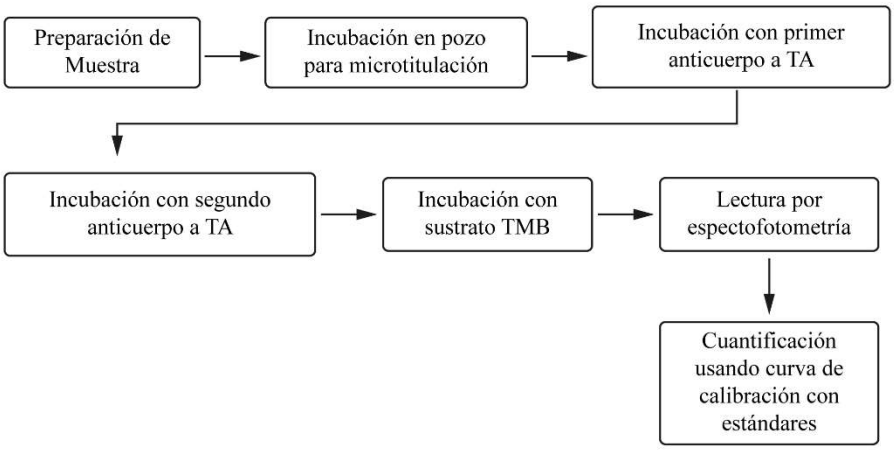
Preparación de Muestra
Incubación en pozo para microtitulación
Incubación con primer anticuerpo a TA
Incubación con segundo anticuerpo a TA
Incubación con sustrato TMB
Lectura por espectofotometría
Cuantificación usando curva de calibración con estándares

FIG. 1

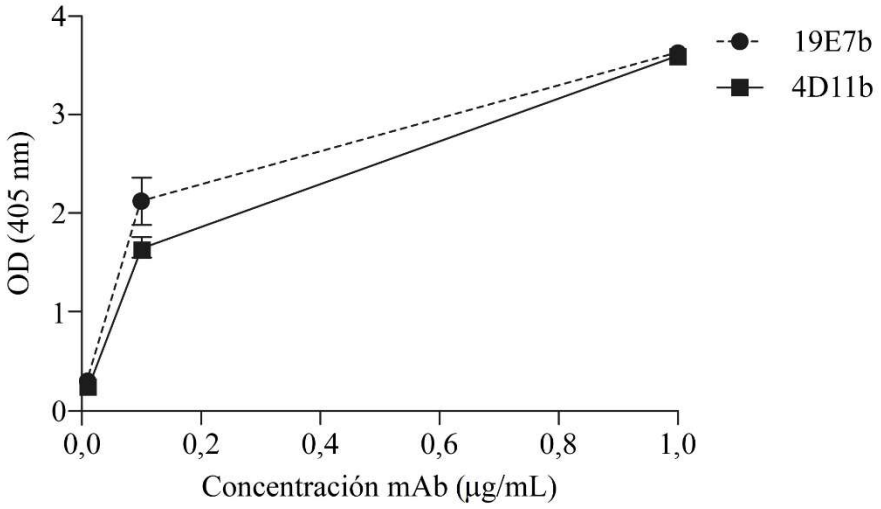
4
3
2
1
0
OD (405 nm)
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
Concentración mAb (µg/mL)
19E7b
4D11b

FIG. 2

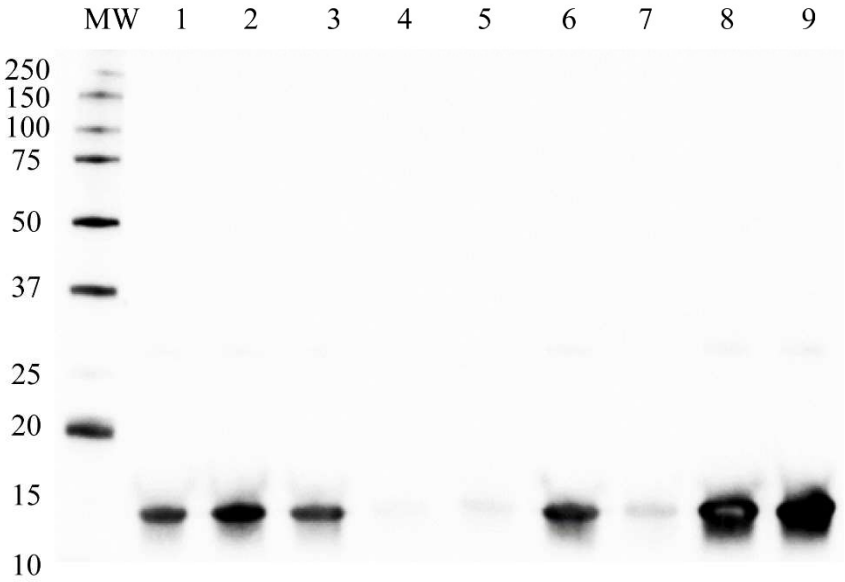

FIG. 3