

Caracterización y producción recombinante de alérgenos, producción de inmunotoxinas y vacunas mRNA como herramientas diagnósticas y terapéuticas en alergia

Breve descripción

La alergia constituye un problema de salud de primer orden, afectando ya a más de un 30% de la población de los países desarrollados. Inicialmente, nuestras investigaciones estaban basadas en el estudio de las características fisicoquímicas e inmunológicas de las moléculas que originan la alergia, los alérgenos, y el abordaje de su producción recombinante para obtener cantidades de estas moléculas con una calidad suficientemente buena para que puedan ser comercializados como herramientas diagnósticas y terapéuticas. Durante los últimos años, la alergia se ha redefinido no solamente como una alteración en la respuesta inmunológica del paciente sino como una disfunción de la barrera epitelial que actúa como interfase entre nuestros ambientes interno y externo y que facilita, o no, el acceso de aquellas moléculas alérgicas que se encuentran en el entorno del organismo. En el caso particular de pacientes asmáticos, se ha observado una alteración en la barrera epitelial respiratoria y hemos demostrado que ocurre lo mismo con el epitelio intestinal en alergias alimentarias.

El estudio de cómo influye el estado fisiológico del epitelio en la respuesta inmune frente a aeroalérgenos o alérgenos alimentarios, y cuáles son los factores que actúan de forma sinérgica con los alérgenos, así como la implicación en la interacción del surfactante pulmonar -la mezcla lípido-proteína que recubre los alveolos de los pulmones- constituyen algunas de nuestras líneas de investigación que ha requerido poner a punto nuevas técnicas de cultivos celulares y de microscopía. Utilizamos varias técnicas entre las que destacan las **proteómicas** y **genómicas** a gran escala para obtener un **perfil diferencial de proteínas, mRNA y miRNA** que nos permita profundizar en el conocimiento de la respuesta alérgica y así poder diseñar nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento.

Nuestro posible papel de colaboración se enfocaría hacia la adaptación de estos sistemas a las necesidades del cliente; esto es, diseñar los protocolos para el aislamiento de la proteína de acuerdo con los requerimientos de calidad o cantidad que nos sean informados y, si fuese requerido, la generación de anticuerpos específicos frente a dicha proteína. También, la producción, mutagénesis y obtención de proteínas modificadas, de derivados análogos a la proteína natural que respondan a necesidades concretas del cliente, su producción recombinante y la posibilidad de asesoramiento para la incorporación de la metodología a la empresa contratante.

¿Cómo funciona?

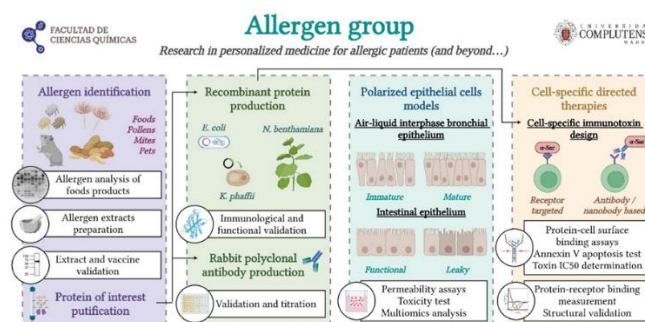


Figura 1. Líneas de investigación del grupo de Alérgenos

Purificamos proteínas a partir de distintos materiales biológicos -pólenes, alimentos vegetales y ácaros- las proteínas responsables de la sensibilización de los pacientes alérgicos. En el laboratorio tenemos una amplia experiencia de más de 30 años en la purificación y caracterización de proteínas, mediante sistemas cromatográficos convencionales y HPLC o FPLC. Mediante electroforesis bidimensional se puede determinar la masa molecular, el punto isoeléctrico y el grado de polimorfismo de un alérgeno particular. Usamos técnicas inmunológicas (ELISA y *Western blot*) y espectroscópicas (absorción UV/Vis, dicroísmo circular y emisión de fluorescencia). Mediante técnicas biofísicas determinamos su actividad bioquímica, como la unión de ligandos o la presencia de oligosacáridos en su estructura.



Producimos alérgenos recombinantes a partir de su correspondiente cDNA, previamente amplificado por PCR, e insertado en un vector génico que sirve de vehículo de expresión. Una vez transformadas con el vector las células del huésped (en general bacterias *-Escherichia coli-*, o levaduras *-K. phaffii-*, células de insecto –vía infección con Baculovirus- o plantas *-Nicotiana benthamiana-*), el cultivo se hace crecer hasta que alcanza unos niveles de producción adecuados de la proteína recombinante. La proteína así producida debe ser purificada hasta homogeneidad, para lo cual se hace uso de sus propiedades químico-físicas, masa molecular, solubilidad, carga, entre otros. Para que la proteína recombinante sustituya eficazmente a la proteína obtenida de la fuente biológica natural, es esencial comprobar que sus propiedades moleculares son equivalentes. Por ese motivo, la caracterización estructural y funcional de la proteína recombinante es una etapa crítica a la hora de valorar el sistema de expresión utilizado.

Diseñamos y producimos anticuerpos policlonales para poder realizar la validación de los alérgenos, tanto naturales como recombinantes.

Diseñamos y producimos inmunotoxinas recombinantes basadas en ribotoxinas, dirigidas a inmunomodular la respuesta alérgica destruyendo aquellos tipos celulares frente a los que estén dirigidas. Utilizamos como dominio marcador, alérgenos, citoquinas o anticuerpos frente a receptores celulares.

¿Qué problema resuelve?

a) Potencia el diagnóstico molecular con alérgenos y extractos optimizados. Hasta hace relativamente poco tiempo las pruebas diagnósticas se realizaban casi exclusivamente con extractos biológicos que constituían mezclas heterogéneas de proteínas y otros compuestos no proteicos. En los últimos años, el diagnóstico molecular llevado a cabo con alérgenos purificados, bien naturales o recombinantes ha solventado en gran medida los problemas iniciales, pero su coste y la complejidad de su puesta a punto impide que sea una prueba diagnóstica que este al servicio de toda la población. Somos un grupo puntero a nivel mundial en alergología molecular habiendo identificado más de 50 alérgenos responsables de alergias respiratorias y alimentarias, que han permitido evaluar el agente causante de la sensibilización y asociarlo con los síntomas clínicos de los pacientes. Por ello tenemos amplia experiencia en la detección (incluidos alérgenos ocultos), caracterización y purificación de proteínas de interés para su uso en clínica. A partir de las proteínas purificadas obtenemos anticuerpos de gran calidad y especificidad para su uso en la validación y cuantificación de alérgenos en productos biosanitarios como las vacunas.

b) La producción y validación de los alérgenos recombinantes. Otro problema importante para resolver es la obtención de alérgenos de calidad en cantidades tales que puedan ser introducidas en el mercado farmacéutico y usarse a nivel clínico. La utilización de **bacterias** (*Escherichia coli*), **levaduras** (*Komagataella phaffii*, antes *Pichia pastoris*) o **plantas de tabaco** (*Nicotiana benthamiana*) permite producir y purificar alérgenos de gran calidad y en cantidades abundantes. Además, se busca mejorar la producción y calidad de alérgenos en sistemas de expresión más seguros y sostenibles para el diagnóstico molecular. Los sistemas vegetales como la planta del tabaco destacan por su bajo coste, alta escalabilidad, menor riesgo de infecciones y eficiencia en la purificación, además de permitir modificaciones postraduccionales claves para la actividad biológica de estas proteínas.

c) Reduce el número de alérgenos necesarios para el diagnóstico molecular mediante el diseño de alérgenos consenso. Podemos producir alérgenos recombinantes consensos obtenidos por **diseño racional** a partir de las **secuencias alineadas** de proteínas de la misma familia de diferentes especies, con aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Dichos alérgenos (podríamos llamarlos Alérgenos Frankenstein) pueden aglutinar todos los epítomos alérgénicos que tengan las proteínas de una misma familia de alérgenos.

d) El reconocimiento mediante técnicas inmunoquímicas mediante la obtención de anticuerpos policlonales frente alérgenos. Nuestro grupo pretende obtener anticuerpos policlonales en conejo de todos los alérgenos que hay en nuestra colección para poder cuantificarlos y detectarlos. Hasta la fecha se han obtenido más de 300 anticuerpos y se ha establecido acuerdos con diferentes compañías.

e) La puesta a punto de modelos celulares de epitelios bronquial e intestinal. Disponemos de sistemas modelo celulares que mimetizan los epitelios bronquial e intestinal humanos en distinto estado de diferenciación. Se ha



conseguido establecer modelos de daño epitelial crónico que simulan epitelios dañados por agentes medioambientales y alérgenos. El grupo tiene puesto a punto ensayos de captura/permeabilidad epitelial, toxicidad celular, expresión y localización subcelular de proteínas y análisis multiómicos (transcriptómica y metabolómica, etc.) contando con la colaboración de los centros de asistencia a la investigación de la UCM.

f) Mejorar los tratamientos mediante el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas: inmunotoxinas y vacunas de mRNA. Nuestro grupo dispone de una amplia experiencia en el diseño, producción y caracterización de inmunotoxinas recombinantes basadas en ribotoxinas, dirigidas inicialmente frente a cáncer y, actualmente, para suprimir o inmunomodular la respuesta alérgica. De este modo, podemos diseñar inmunotoxinas utilizando como dominio marcador alérgenos, citoquinas o anticuerpos frente a receptores implicados en la respuesta alérgica. Del mismo modo, disponemos de las herramientas y colaboraciones necesarias para el diseño de vacunas de mRNA basadas en secuencias consenso de alérgenos.

¿Qué productos futuros resultarán?

Dispondremos de extractos optimizados de las distintas fuentes alérgicas, alérgenos purificados a partir de la fuente natural, alérgenos recombinantes en aquel sistema de expresión que resulte más adecuado para cada proteína, quimeras de familias alérgicas para tener alérgenos consenso que puedan aglutinar los epítomos de todas las moléculas de la misma familia, inmunotoxinas que contengan un marcador de especificidad frente a las moléculas y células específicas de alergia y un dominio efector que destruya dichas células específicas y por último, la producción de anticuerpos policlonales.

Ventajas competitivas frente a otras investigaciones

La purificación de alérgenos y su producción recombinante proporciona un sistema de obtención ilimitada de proteínas altamente homogéneas cuya presencia en la naturaleza es escasa, inestable o, en todo caso, que su aislamiento implique dificultades. Además, se pueden preparar fragmentos o, por mutagénesis dirigida, derivados de esas moléculas que posean propiedades de estabilidad o actividad biológica modificadas. Nuestras investigaciones han dado lugar a un diagnóstico más potente y eficaz para los pacientes alérgicos.

¿Dónde se ha desarrollado?

Estas tecnologías han sido desarrolladas en el **Departamento de Bioquímica y Biología Molecular** de la Facultad de CC. Químicas de la Universidad Complutense de Madrid. Más de 20 proteínas se han producido en *E. coli*, más de 15 en *P. pastoris* y Baculovirus y, recientemente, también en *Nicotiana benthamiana*. Estos alérgenos se han purificado, y el análisis de sus propiedades estructurales y funcionales ha mostrado que son equivalentes a las correspondientes formas producidas en la naturaleza.

Y además...

Nuestro posible papel de colaboración se enfocaría hacia la adaptación de estos sistemas a las necesidades del cliente; esto es, diseñar los protocolos para el aislamiento de la proteína de acuerdo con los requerimientos de calidad o cantidad que nos sean informados y, si fuese requerido, la generación de anticuerpos específicos frente a dicha proteína. También, la producción, mutagénesis y obtención de proteínas modificadas, de derivados análogos a la proteína natural que respondan a necesidades concretas del cliente, y la posibilidad de asesoramiento para la incorporación de la metodología a la empresa contratante.

Responsable de la investigación

Mayte Villalba Díaz, mvillalb@ucm.es

Departamento: **Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

Facultad: **Facultad de Ciencias Químicas**
