



Reaccions adverses a penicil·lines: Noves eines per la prevenció i el diagnòstic

Sonia Matas Moya

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Tesi doctoral

**Reaccions adverses a penicil·lines:
Noves eines per la prevenció i el diagnòstic.**

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona per:

Sonia Matas Moya

Universitat de Barcelona
Departament de Química Orgànica

Programa de Doctorat de Química Orgànica

**Reaccions adverses a penicil·lines:
Noves eines per la prevenció i el diagnòstic**

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona per:

Sonia Matas Moya

Directors:

Dr. Roger Galve Bosch

Investigador
Nanobiotechnology for Diagnostics
group (Nb4D).
Department of Chemical and
Biomolecular Nanotechnology
IQAC-CSIC.

Tutor:

Prof. M^a Pilar Marco Colás

Professor Investigador
Nanobiotechnology for Diagnostics
group (Nb4D).
Department of Chemical and
Biomolecular Nanotechnology
IQAC-CSIC.

Prof. M^a Pilar Marco Colás

Professor Investigador
Nanobiotechnology for Diagnostics
group (Nb4D).
Department of Chemical and
Biomolecular Nanotechnology
IQAC-CSIC.

AGRAIMENTS

Primer de tot he d'agrair als meus directors, Roger i Pilar, que em donessin la oportunitat de fer aquesta Tesi. Sobretot els agraeixo el suport que sempre m'han donat, tant en els bons moments com en els dolents i la confiança que han dipositat en mi per tirar endavant aquest projecte.

Bona part d'aquest treball també ha sortit de la convivència amb tots els meus companys de laboratori, amb els que he viscut els millors i també els pitjors moments succeïts durant el transcurs d'aquests anys de Tesi. He après moltes coses de tots ells. Especialment no puc deixar de mencionar als grans amic que pogut conèixer gràcies al meu pas per aquest grup, com son l'Enrique, que sempre ha estat al meu costat quan he necessitat desfogar-me o fer unes bones rialles, el Raül, amb qui he pogut contar per fer una birra quan més ho he necessitat, l'Àlex amb qui he compartit molt bons moments fent birres i pacharans al Versailles, i com no la meva gran amiga Ester amb qui he compartit pràcticament tot durant aquests 4 anys, penes, alegries, farres, ressaques, immunitzacions...Gràcies a tots 4 per fer-me la vida més fàcil.

No em puc deixar d'agrair a la meva família, mama, papa i sister que, cadascun a la seva manera han fet que jo pugui arribar fins aquí. Sense el vostre suport això no s'hauria tirat endavant. També agrair a la meva altra família, els meus "cuñis", per tenir sempre una cervesa a la mà per oferir-me quan més ho he necessitat, i als meus "suegris", que han estat com uns segons pares per mi.

A més de la meva germana biològica, que tot i les nostres diferències no podem viure una sense l'altre, també he de mencionar a les meves dos altres germanes, la Sira i la Carmen. Amb elles he compartit mitja vida i espero que continuï així per sempre. Son tantes coses, les que hem viscut juntes que no acabaria mai de nombrar-les. Amb elles m'he fet gran i la persona que soc avui dia li dec en gran part a elles. He de fer una menció especial a la Sira, a qui conec des de que tinc 5 anys i amb qui he anat descobrint la vida poc a poc, fins i tot el doctorat. **MOLTES GRÀCIES A LES DOS!**

I finalment, he d'agrair al gran amor de la meva vida, al meu company, al meu amic, tot el suport que m'ha estat demostrant dia rere dia des de que ens coneixem, ja fa casi 9 anys. Gràcies a ell aquesta Tesi i moltes altres coses s'han fet possibles. **GRACIAS POR ESTAR SIEMPRE A MI LADO CHEMA.**

PRÒLEG

Tota la feina descrita en aquest treball es divideix en dos grans blocs que estan directament relacionats amb els dos objectius principals que s'exposaran més endavant.

El primer gran bloc està relacionat amb el diagnòstic d'al·lèrgies a penicil·lines, un camp molt lligat a la medicina i on els meus directors i jo hem hagut de fer grans esforços per obrir-nos pas i, des d'un punt de vista químic hem intentat aportar nous coneixements i solucions a la problemàtica establerta al voltant de les al·lèrgies a fàrmacs i el seu diagnòstic clínic. Creiem que hem sigut capaços de fer un pas endavant en la comprensió d'aquest tipus d'al·lèrgies.

El segon gran bloc forma part de la detecció d'antibiòtics en mostres d'aliments. En concret s'ha treballat en el desenvolupament de sistemes de detecció de penicil·lines, més concretament amoxicil·lina. Aquest bloc intenta descriure acuradament els diversos problemes que ens hem anat trobant fins arribar als resultats finals, assolits satisfactòriament.

D'altra banda, amb la finalitat de millorar la comprensió del conjunt global d'aquest treball tant la introducció com la discussió de resultats s'inicien amb un esquema on s'intenta fer un esforç de síntesi relacionant tots els conceptes bàsics i més importants per poder entendre el treball desenvolupat durant aquesta tesi doctoral.

Espero que aquest aclariments siguin d'utilitat per entendre el contingut general d'aquest treball.

INDEX GENERAL

Abreviatures	11
Resum	15
1. Introducció	17
1.1. Reaccions adverses a fàrmacs	21
1.1.1. Definició	21
1.1.2. Classificació	22
1.1.2.1. Tipus B: reaccions adverses a fàrmacs de tipus idiosincràtic	23
a. Possibles mecanismes d'actuació de les RIF	24
• Hipòtesi de l'haptè	
• Hipòtesi del perill	
• Hipòtesi de la interacció farmacològica	
• Hipòtesi no-immune	
b. Determinants genètics de les RIFs	31
1.1.2.2. Símtomes clínics de les RIFs	31
1.2. Sistema immunològic	33
1.2.1. Resposta immune inespecífica	34
1.2.2. Resposta immune específica	34
1.2.2.1. Reconeixement de l'antigen	35
1.2.2.2. Interacció cel·lular	35
1.2.2.3. Immunomoduladors de la resposta immune	36
1.2.2.4. Resposta immune cel·lular	36
1.2.2.5. Resposta immune humoral	37
1.2.2.6. Característiques de la resposta immune específica	37
1.2.3. Resposta primària i secundària	38
1.2.4. Concepte d'antigen i haptè	40
1.2.5. Immunoglobulines	40
1.2.5.1. Estructura de les immunoglobulines	42
a. Part variable i constant de les cadenes lleugeres i pesades	42
b. Subclasses de les immunoglobulines	43
c. Distribució de les immunoglobulines	43
d. Propietats i funcions de cadascuna de les immunoglobulines	44
• Immunoglobulina G	
• Immunoglobulina M	
• Immunoglobulina A	
• Immunoglobulina D	
• Immunoglobulina E	
1.3. Reaccions d'hipersensibilitat	47
1.3.1. Classificació de Gell-Coombs	47
1.3.1.1. Reacció d'hipersensibilitat de tipus I	47
1.3.1.2. Reacció d'hipersensibilitat de tipus II	49
1.3.1.3. Reacció d'hipersensibilitat tipus III	50
1.3.1.4. Reacció d'hipersensibilitat de tipus IV	51
1.4. Al·lèrgia a fàrmacs	52
1.4.1. Sulfonamides	53
1.4.2. NSAIDs	53

1.4.3.	Altres fàrmacs que provoquen RAFBI	54
1.4.4.	β -lactames	54
1.5.	Mètodes de diagnòstic	58
1.5.1.	Diagnòstic dels tests de pell	58
1.5.1.1.	Test de pell epicutani	59
1.5.1.2.	Test de pell intradèrmic	59
1.5.2.	Test de provocació <i>in vivo</i>	60
1.5.3.	Test <i>in vitro</i> pel diagnòstic immunològic	60
1.5.3.1.	Assaig de proliferació limfocitari (LPA)	60
1.5.3.2.	Test d'estimulació cel·lular amb l'al·lergen (CAST)	61
1.5.3.3.	Test d'activació dels basòfils (BAT)	61
1.5.3.4.	Detecció de les IgEs específiques	62
a.	RAST (radioal·lergosorbent test)	62
b.	EIA (Enzyme immunoassay)	63
1.5.3.5.	Problemàtica derivada dels sistemes de detecció actuals per a IgE específiques a fàrmacs β -lactàmics	63
1.6.	Els antibiòtics: Implicacions generals	64
1.6.1.	La utilització de fàrmacs antibacterians en humans	64
1.6.1.1.	Inhibició de la paret bacteriana	64
1.6.1.2.	Inhibidors de la síntesi de proteïnes	65
1.6.1.3.	Inhibidors dels àcids nuclèics	66
1.6.1.4.	Inhibidors de la producció d'àcid fòlic	67
1.6.2.	L'ús de penicil·lines en medicina veterinària	68
1.6.3.	Presència de penicil·lines en els aliments	68
1.6.4.	Conseqüències en la producció d'aliments	69
1.6.5.	Conseqüències en el medi ambient per l'ús de penicil·lines	70
1.6.6.	Legislació referent a les penicil·lines	71
1.6.6.1.	Regulació 2377/90/EEC	71
1.6.6.2.	Directives i comissions de decisió referents a penicil·lines	72
1.6.7.	Penicil·lines	74
1.6.7.1.	Estructura i classificació	74
a.	Les penicil·lines naturals	74
b.	Penicil·lines resistents a la penicil·linasa	74
c.	Aminopenicil·lines	74
d.	Penicil·lines d'ampli espectre	75
1.6.7.2.	Mecanisme d'acció de les penicil·lines	75
1.6.7.3.	Resistència bacteriana	76
a.	Producció de β -lactamases	76
b.	Modificació dels centres de les BPO	77
c.	Bloqueig de l'entrada	77
1.6.7.4.	Producció de penicil·lines	78
1.6.7.5.	Mètode de detecció de penicil·lines	79
a.	Cromatografia	79
b.	Mètodes de detecció ràpida	79
•	Test d'inhibició microbiana	
•	Assaigs basats en receptors. Dispositius de flux lateral	
•	Assaig radiomarcats	

• Assaigs immunoenzimàtics (ELISA)	
1.7. Objectius	84
2. Disseny i síntesi de sondes peptídiques per a la utilització en diagnòstic clínic	89
2.1 Introducció a la síntesi de pèptids en fase sòlida	89
2.1.1. El suport polimèric	90
2.1.2. Estratègies de protecció	92
2.1.3. Elongació de la cadena peptídica: reactius d'acoblament	95
2.1.4. Desprotecció i desancoratge de pèptids de les resines seguint l'estratègia Fmoc/tBu	97
2.2. Sondes peptídiques per al diagnòstic d'al·lèrgies	98
2.2.1. Disseny de les sondes peptídiques	99
2.2.2. Síntesi de les sondes peptídiques	101
2.2.3. Producció de nous determinants antigènics derivats de l'amoxicil·lina	105
2.2.3.1. Optimització de la reacció a escala analítica	106
2.2.3.2. Obtenció i separació dels adductes amoxicil·línics	107
2.2.3.3. Elucidació estructural dels adductes amoxicil·línics	112
2.3. Resum i conclusions del capítol	119
3. Disseny i síntesi d'antígens penicil·línics	121
3.1. Disseny dels immunògens	121
3.1.1. L'immunogen	121
3.2. Disseny dels haptens penicil·línics	122
3.3. Síntesi dels haptens penicil·línics	124
3.3.1. Síntesi dels haptens de tipus 1	124
3.3.2. Síntesi dels haptens de tipus 2	124
3.3.3. Síntesi dels haptens de tipus 3 i 4.	125
3.4. Agents entrecreuadors bifuncionals	126
3.4.1. Proteïnes/polisacàrids transportadors	127
3.4.2. Nomenclatura dels antígens i immunògens	128
3.5. Producció dels antígens i immunògens	129
3.5.1. Antígens de grup 1	130
3.5.2. Antígens de grup 2	131
3.5.3. Antígens de grup 3	133
3.5.4. Antígens de grup 4	134
3.6. Caracterització dels antígens	134
3.7. Resum i conclusions del capítol	136
4. Detecció d'amoxicil·lina en mostres de llet	137
4.1. Els immunoassaigs	137
4.1.1. La importància de l'anticòs en els immunoassaigs	137
4.1.2. Tipus d'immunoassaigs	139
Assaigs competitiu directes	
Assaig competitiu indirecte	
4.1.3. Anticossos policlonals vers monoclonals (PABs vs MABs)	141
4.1.3.1. Descripció general	141
4.1.3.2. Avantatges i desavantatges dels PABs i MABs	142
4.2. Protocol d'immunització per PABs	143
4.2.1. Evolució del títol de l'anticòs	143

4.3.	Avaluació dels anticossos policlonals	144
4.4.	Assaigs competitius	145
4.5.	Assaigs amb els anticossos policlonals	147
4.5.1.	Resultats i discussió	147
a.	Resultats per a les penicil·lines	147
b.	Resultats per a l'àcid amoxiciloic	150
4.5.2.	Resum i conclusions de la producció d'anticossos policlonals	151
4.6.	Producció d'anticossos monoclonals	151
4.6.1.	Procés d'immunització	151
4.6.2.	Extracció de sangs parcials i títols	152
4.7.	Avaluació dels anticossos monoclonals	154
4.7.1.	Fusió	154
4.7.2.	Cartografia dels clons	155
4.7.3.	Primer cribatge	155
4.7.4.	Segon cribatge dels clons del ratolí 1	157
4.7.5.	Segon cribatge dels clons del ratolí 3	157
4.7.6.	Clonació dels híbridomes del ratolí 3	157
4.8.	Resum i conclusions de la producció d'anticossos monoclonals	158
5.	Diagnòstic d'al·lèrgies a penicil·lines mitjançant la detecció d'IgEs específiques	159
5.1.	Introducció	159
5.2.	Assaigs tipus ELISA	160
5.2.1.	Validació dels adductes	160
5.2.2.	Avaluació de les mostres de pacients al·lèrgics a penicil·lines	162
a.	Assaigs amb els adductes amoxicil·línics NKAx	163
b.	Assaigs amb els antígens amoxicil·línics	165
5.3.	Assaigs tipus magneto-ELISA per l'avaluació dels sèrums específics amb els adductes NKAx	166
5.3.1.	Preparació de les partícules magnètiques	166
5.3.2.	Validació dels adductes	167
5.3.3.	Optimització de les condicions d'assaig mitjançant sèrums no específics (Blancs)	168
5.3.4.	Avaluació de mostres de pacients al·lèrgics a penicil·lines	168
5.4.	Microarrays (Micromatrius)	172
5.5.	Desenvolupament d'un microarray per al diagnòstic d'al·lèrgies a penicil·lines	174
5.5.1.	Funcionalització de la superfície de vidre	174
5.5.2.	Immobilització dels bioconjugats	174
5.5.2.1.	Immobilització dels adductes NKAx	174
5.5.2.2.	Immobilització dels antígens penicil·línics	175
5.5.3.	Validació dels adductes	176
5.5.4.	Validació dels antígens	178
5.5.5.	Optimització de les condicions d'assaig amb sèrums no específics	180
5.5.6.	Mostres de sèrums de pacients al·lèrgics a penicil·lines	180
5.5.6.1.	Detecció d'IgEs específiques a amoxicil·lina	180
5.5.6.2.	Detecció de IgGs específiques a amoxicil·lina	181
5.6.	Resum i conclusions del capítol	182

6.	Conclusions	185
7.	Materials i mètodes	189
7.1.	Part sintètica	189
7.1.1.	Materials i instrumentació	189
7.1.2.	Síntesi de les sondes peptídiques	191
7.1.2.1.	Derivatització dels aminoàcids	191
7.1.2.1.1.	Procediment general	191
7.1.2.2.	Síntesi de pèptids en fase sòlida mitjançant l'estratègia Fmoc/tBu	193
7.1.2.2.1.	Assaig de ninhidrina qualitatiu	193
7.1.2.2.2.	Assaig per determinar el grau de conjugació	194
7.1.2.2.3.	Tractament inicial de la resina	194
7.1.2.2.4.	Activació del primer aminoàcid (AA ₁)	194
7.1.2.2.5.	Unió del AA ₁	194
7.1.2.2.6.	Elongació de la cadena peptídica	195
7.1.2.2.7.	Desprotecció de les cadenes laterals del pèptid i desancoratge de la resina	195
7.1.2.2.8.	Cromatografia líquida d'alta eficàcia	196
7.1.2.2.9.	Síntesi del pèptid NBD-GKK(Biotin)G-OH (4)	196
7.1.2.2.10.	Síntesi del pèptid NBD-DKK(Biotin)G-OH (5)	197
7.1.2.2.11.	Síntesi del pèptid NBD-D(Me)KK(Biotin)βA-OH (6)	198
7.1.2.2.12.	Síntesi del pèptid 5-FAM-KK(Biotin)βA-OH (7)	200
7.1.2.2.13.	Síntesi del pèptid NBD-D(Me)KβA-OH (8)	201
7.1.2.2.14.	Síntesi del pèptid NBD-D(Me)βA-OH (9)	203
7.1.2.2.15.	Síntesis del pèptid DNP-GKβA-OH (10)	204
7.1.3.	Formació dels adductes	206
7.1.3.1.	Preparació dels tampons	206
7.1.3.2.	Optimització de la reacció a escala analítica	206
7.1.3.3.	Procediment general a escala semipreparativa	207
7.1.3.3.1.	Separació dels adductes per cromatografia líquida d'alta eficàcia	208
7.1.3.3.2.	Determinació de la concentració dels adductes	209
7.1.3.3.3.	Adducte NKAx1 (11)	210
7.1.3.3.4.	Adducte NKAx2 (12)	211
7.1.3.3.5.	Adducte NKAx3 (13)	211
7.1.3.3.6.	Adducte FKAx1 (14)	212
7.1.3.3.7.	Adducte FKAx2 (15)	213
7.1.3.3.8.	Adducte FKAx3 (16)	213
7.1.3.4.	Elucidació estructural dels adductes. Simplificació estructural de les sondes peptídiques	214
7.1.3.4.1.	Formació de l'adducte utilitzant la sonda NBD-D(Me)KβA-OH (8)	214
7.1.3.4.1.1.	Escalat de la reacció	215
7.1.3.4.2.	Formació de l'adducte utilitzant la sonda NBD-D(Me)βA-OH (9)	219
7.1.3.4.3.	Formació de l'adducte utilitzant la sonda DNP-GKβA-OH (10)	220
7.1.4.	Síntesi dels haptens	220
7.1.4.1.	Síntesi dels braços espaciadors provinents de l'àcid acètic	220
7.1.4.1.1.	Procediment general	220

7.1.4.2.	Síntesi del 3-maleimidopropanoat de succinimida	222
7.1.4.3.	Síntesi dels dímers penicil·línics	223
7.1.4.3.1.	Síntesi del 4,4'-ditiodibutiroat de succinimida (22)	223
7.1.4.3.2.	Procediment general	223
7.1.4.4.	Derivatització de les aminopenicil·lines	226
7.1.4.4.1.	Protecció del grup amino amb el grup protector Teoc	226
7.1.4.4.1.1.	Procediment general	226
7.1.4.4.2.	Protecció del grup amino amb el grup protector Boc	228
7.1.4.4.3.	Síntesi de l'àcid amoxiciloic (28)	229
7.1.4.4.3.1.	Procediment general	229
7.2.	Part immunoquímica	230
7.2.1.	Materials i instrumentació	230
7.2.1.1.	Reactius químics i immunoquímics	230
7.2.1.2.	Tampons	231
7.2.2.	Preparació dels immunoreactius	232
7.2.2.1.	Síntesis dels immunògens	232
7.2.2.1.1.	Síntesis de l'immunogen Amx1-PLL	232
7.2.2.1.2.	Síntesis de l'immunogen Amx2-Br/Mp-HCH	234
7.2.2.2.	Síntesis i caracterització dels competidors	236
7.2.2.2.1.	Caracterització dels conjugats. Determinació de la densitat d'haptè	237
7.2.2.2.2.	Grup 1. Conjugació a la proteïna a través del grup -COOH de l'anell tiazolidínic	237
7.2.2.2.3.	Grup 2. Conjugació a la proteïna a través de la derivatització de les aminopenicil·lines del grup amino a un grup tiol	239
7.2.2.2.4.	Grup 3. Conjugació a la proteïna a través del grup amino de les aminopenicil·lines	241
7.2.2.2.5.	Grup 4. Conjugació a la proteïna a través de l'obertura de l'anell β -lactàmic	242
7.2.3.	Obtenció dels anticossos policlonals específics	243
7.2.3.1.	Protocol d'immunització	243
7.2.3.2.	Extracció de les sangs parcials. Avaluació del títol d'anticòs	243
7.2.3.3.	Obtenció de les sangs finals	243
7.2.4.	Assaigs immunoenzimàtics no competitiu	244
7.2.4.1.	Assaig no competitiu en format indirecte	244
7.2.4.1.1.	Protocol general	244
7.2.4.1.2.	Assaig monodimensional (1D) no competitiu	244
7.2.4.1.3.	Assaig bidimensional (2D) no competitiu	245
7.2.4.2.	Assaig no competitiu en format directe	246
7.2.4.2.1.	Protocol general	246
7.2.4.2.2.	Assaig monodimensional (1D) no competitiu	246
7.2.4.2.3.	Assaig bidimensional (2D) no competitiu	246
7.2.5.	Assaigs immunoenzimàtics competitiu	247
7.2.5.1.	Protocol general per a un ELISA en format directe	247
7.2.5.2.	Protocol general per a un ELISA en format indirecte	247
7.2.5.3.	Factors estudiats per a la optimització d'un assaig competitiu	248
7.2.5.3.1.	Influència de la concentració de Tween 20 en l'assaig	248

7.2.5.3.2.	Influència del temps de preincubació	248
7.2.5.3.3.	Influència del temps de competència	248
7.2.5.3.4.	Influència del pH	248
7.2.5.3.5.	Influència dels dissolvents orgànics	249
7.2.6.	Obtenció dels anticossos monoclonals	249
7.2.6.1.	Protocol d'immunització	249
7.2.6.2.	Extracció de les sangs parcials. Avaluació del títol de l'anticòs	249
7.2.6.3.	Descongelació de les cèl·lules de mieloma	250
7.2.6.4.	Obtenció de la melsa	250
7.2.6.5.	Cèl·lules de mieloma	251
7.2.6.6.	Fusió	251
7.2.6.7.	Primer criatge	252
7.2.6.8.	La clonació a partir de les cèl·lules del ratolí 3	253
7.2.6.9.	Segon criatge de les cèl·lules fusionades del ratolí 1	253
7.2.6.10.	Criatge dels clons provinents del ratolí 3	254
7.2.7.	Assaigs de detecció d'immunoglobulines E específiques contra amoxicil·lina	254
7.2.7.1.	Assaigs immunoenzimàtics en superfície	254
7.2.7.1.1.	Optimització de la concentració d'estreptavidina	254
7.2.7.1.2.	Assaigs immunoenzimàtics en format indirecte. Procediment general	255
7.2.7.1.3.	Assaig immunoenzimàtic en format directe	255
7.2.7.1.3.1.	Validació dels adductes. Procediment general	255
7.2.7.1.3.2.	Mostres de sèrums específics	256
7.2.7.2.	Assaigs immunoenzimàtic sobre partícula magnètica	256
7.2.7.2.1.	Funcionalització de les partícules magnètiques	256
7.2.7.2.2.	Assaig immunoenzimàtic en format directe	257
7.2.7.2.2.1.	Validació dels adductes. Procediment general	257
7.2.7.2.2.2.	Mostres de sèrums específics. Procediment general	258
7.2.7.2.2.3.	Factors estudiats per a l'optimització de l'assaig	259
7.2.7.3.	Immunoassaig per fluorescència sobre superfície de vidre	259
7.2.7.3.1.	Funcionalització de les superfícies de vidre	259
7.2.7.3.2.	Formació del complex estreptavidina-NKAx/pèptid 6	260
7.2.7.3.3.	Immobilització dels bioconjugats sobre la superfície de vidre	260
7.2.7.3.4.	Immunoassaig fluorescent de validació dels antígens i dels complexos estreptavidina-NKAx/pèptid 6	263
7.2.7.3.5.	Procediment general per a l'immunoassaig fluorescent en mostres de sèrums específics	263
7.2.7.3.6.	Factors estudiats per a l'optimització de l'assaig	264
7.2.8.	Assaigs de detecció d'immunoglobulines G específiques contra amoxicil·lina	266
7.2.8.1.	Immunoassaig per fluorescència sobre superfície de vidre	266
7.2.8.1.1.	Procediment general per a l'immunoassaig fluorescent en mostres de sèrums específics	266
<i>Annex 1</i>		269
<i>Annex 2</i>		271
<i>Annex 3</i>		281

<i>Annex 4</i>	283
<i>Annex 5</i>	287
<i>Annex 6</i>	291
<i>Annex 7</i>	293
8. Bibliografia	297

A/Abs	Absorbància
AA	Aminoàcid
Ab	Anticòs
ACN	Acetonitril
AcOH	Àcid acètic
AD	Aminodextrà
Ag/AT	Antigen
Amx	Amoxicil·lina
Amp	Ampicil·lina
AMPS	Aminometilpoliestirè
Anh.	Anhidre
AOP	Hexafluorofosfat de (7-Azabenzotriazol-1-iloxi)-tris(dimetilamino)fosfoni
AP	Alcalinofosfatasa
6-APA	Àcid 6- aminopenicil·lànic
As	Antisèrum
Asp (D)	Àcid aspàrtic
Atm.	Atmosfera
BAT	Test d'activació dels basòfils
BOC	Grup tert-butiloxicarbonil
BOP	Hexafluorofosfat de (benzotriazol-1-iloxi)-tris(dimetilamino)fosfoni
BPO	Benzilpeniciloil polilisna
BSA	Albúmina sèrica bovina
Bzl	Grups benzílics
C	Complement
CAST	Test d'estimulació cel·lular amb l'al·lergen
CCF	Cromatografia en capa fina
CH	Part constant de la cadena pesada
Chx	Ciclohexil
Cl	Part constant de la cadena lleugera
CMH	Complex major d'histocompatibilitat
COSY	Espectroscòpia de correlació de 2 dimensions
CPA	Cèl·lules presentadores d'antígens
DAD	Detector de diode array
DBPP	Resina de poliestirè de di(n-butil)fenilfosfina
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-e
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometà
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
d.h.	Densitat d'haptè
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DIEA	Diisopropiletilamina
DKP	Dicetopiperazina
DMF	Dimetilformamida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNP	Dinitrofenol
DPT	Test de provocació a fàrmacs
DTE	Ditioeritriol
DRESS	Drug Rash With Eosinophilia and Systemic Symptoms
EC₅₀	Concentració mitja inhibidora màxima
EDT	1,2-Etandiol

EIA	Immunoassaig enzimàtic
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	Agència de Medicina Europea
EMEA	Agència Europea per a l'Avaluació dels Productes Mèdics
ESI	Electrosray
Fab	Regió variable de l'anticòs
FAM	Fluoresceïna
Fc	Regió constant de l'anticòs
FIA	Immunoassaig fluorescent
Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonil
GC	Cromatografia de gasos
Gly (G)	Glicina
GO	Glucosa oxidasa
GPTS	3-glicidoxipropil trimetoxisilà
HAT	Hipoxantina-aminopterina-timidina
HATU	Hexafluorofosfat de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluroni
HBTU	Hexafluorofosfat de <i>O</i> -(Benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetra methyluroni
HCH	Hemocianina de cran ferradura
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOAT	1-Hidroxi-7-azabenzotriazole
HOBT	1-Hidroxibenzotriazole
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HRMS	Espectrometria de masses d'altra resolució
HRP	<i>Peroxidasa de rave picant</i>
HSA	<i>Albúmina de sèrum humà</i>
HSP	<i>Proteïnes de xoc tèrmic</i>
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
IDA	Ingesta diària admissible
IDF	Federació Internacional de Lleteria
IgA	Immunoglobulina A
Ig D	Immunoglobulina D
IgE	Immunoglobulina E
IgG	Immunoglobulina G
IgM	Immunoglobulina M
IL	Interleucina
IM	Medi incomplet
INF	Interferó
IR	Infrarroig
J	Constant d'acoblament
Kg	Kilogram
KLH	Hemocianina de molusc Keyhole
LAH	Antigen limfocitari humà
LC	Cromatografia de gassos
LOD	Límit de detecció
LOQ	Límit de quantificació
LPA	Assaig de proliferació limfocitari
Lys (K)	Lisina
M	Molar
MAbs	Anticòsos monoclonals
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization
MDM	Minor determinant mixture

mg	Milígrams
MHz	Megahertz
MIA	Immunoassaigs magnètics
Min.	Minuts
mM	Mil·limolar
mmol	Mil·limol
mL	Mil·lilitre
Mp	Maleimido
MP	Partícules magnètiques
Mult.	Multiplet
MRL	Límit màxim de residus permès
mRNA	RNA missatger
MS	Espectrometria de masses
NBD-Cl	4-cloro-7-nitrobenzofurazan
NHS	N-hidroxisuccinimida
NK	Natural Killer
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
NP3	Medi complet
NSAIDs	Fàrmacs antiinflamatoris no esteroidals
N-SBrA	Bromoacetat de <i>N</i> -succinimidil
N-SIA	Iodoacetat de <i>N</i> -succinimidil
N-SMP	Propanoat de <i>N</i> -succinimidil-3-maleimidil
OMS	Organització mundial de la salut
OVA	Ovoalbúmina
PABA	Àcid <i>p</i> -aminbenzoic
PAbs	Anticossos policlonals
PBP	Proteïna d'unió a penicil·lines
PBS	Tampó de fosfat salí
PBST	Tampó de fosfat salí amb Tween 20
PEG	Polietilenglicol
PG/PenG	Penicil·lina G
PG_p	Grup protector permanent
PG_T	Grup protector temporal
Plys/PLL	Polilisina
PM	Pes molecular
PPD	Tuberculina vella
PPL	Penicilioil-polilisina
Prot.	Proteïna
PS	Resines de pliestirè
PTFE	Tefló
PV/PenV	Penicil·lina V
PM	Pes molecular
RC	Reactivitat creuada
RCT	Receptor de cèl·lula T
RAF	Reaccions adverses a fàrmacs
RAFBI	Reaccions adverses a fàrmacs de base immunològica
RAST	Radioallergonsorbent test
R_f	Velocitat de flux
RIA	Radioimmunoassaig
RIF	Reacció idiosincràtica a fàrmacs
RMN	Ressonància magnètica nuclear

RP	Fase reversa
Rpm	Revolucions per minut
SSC	Citrat de sodi solució salina
SDS	Dodecilsulfat de sodi
SJS	Síndrome de Stevens-Johnson
SPPS	Síntesi de pèptids en fase sòlida
Stav	Estreptavidina
^tBu	Tert-butil
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambient
TATU	Tetrafluoroborat de <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluroni
TBAF	Fluorur de tetrabutilamoni
TBTU	Tetrafluoroborat de 2-(1-H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
Tc	Limfòcits T citotòxics
TE	Traçador enzimàtic
TEN	Necròlisis tòxica epidèrmica
Teoc	Grup 1-[2-(trimetilsilil)etoxicarboniloxi]-
TFA	Àcid tetrafluoroacètic
TFMSA	Àcid trifluorometasulfònic
Th	Limfòcit T ajudant
TIS	Triisopropilsilà
TLC	Cromatografia en capa fina
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TMSOTf	Triflat de tetrametilsilil
TOF	Detector de temps de vol
T_R	Temps de retenció
TRITC	Rodamina funcionalitzada amb tiocianat
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometà
tRNA	RNA de transferència
UA	Unitat d'Absorbància
UI	Unitat Internacional
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography
UV	Ultravioleta
VH	Part variable de la cadena pesada
VL	Part variable de la cadena lleugera
WHO	World Health Organization
β-Ala (β-A)	β-Alanina
βG	β-galactosidasa
δ	Desplaçament químic
ε	Coeficient d'extinció molar
η, rend	Rendiment
°C	Graus centígrads
λ	Longitud d'ona

En la present tesi doctoral s'ha plantejat com un dels principals objectius desenvolupar un sistema de diagnòstic *in vitro* per a detectar al·lèrgies a fàrmacs β -lactàmics, i més concretament contra amoxicil·lina, una de les penicil·lines més utilitzades com a antibiòtic avui dia. Per tal d'aconseguir els determinants antigènics necessaris per desenvolupar l'assaig desitjat s'han utilitzat dos estratègies.

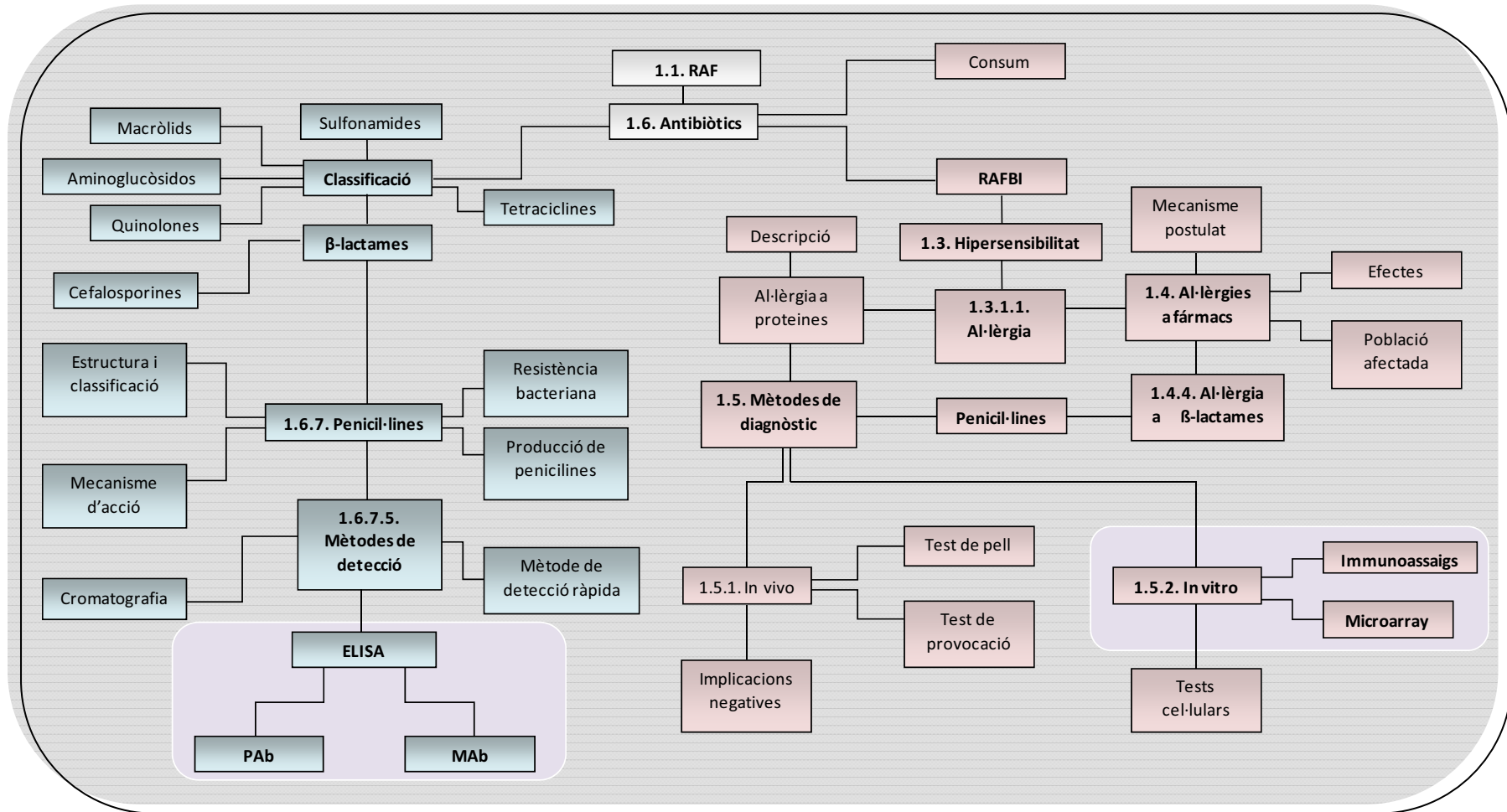
Una d'elles consisteix en la producció d'antígens a partir de la conjugació de proteïnes a penicil·lines. Mitjançant aquesta estratègia s'han aconseguit obtenir un total de 17 antígens que es poden classificar en 4 grups diferents, en funció del tipus d'haptè i mètode de conjugació utilitzat.

L'altra estratègia utilitzada és molt més innovadora. Consisteix en la preparació d'una sèrie de sondes peptídiques mitjançant síntesi en fase sòlida. Aquestes sondes, totalment caracteritzades per RMN i MS, han resultat ser reactives a amoxicil·lina i generar diferents epítops, simulant la unió que pot haver entre una proteïna endògena i el fàrmac abans de desenvolupar una reacció d'hipersensibilitat. Però amb la gran avantatge que aquests adductes han pogut ser aïllats (gràcies a la incorporació d'un grup cromòfor en la sonda peptídica) i caracteritzats per RMN i MS. Concretament, durant aquest treball s'han aconseguit aïllar 3 adductes, dos en medis aquosos isotònics a pH 4,7 i un a pH 11. L'adducte aïllat a pH 11 es correspon amb el que es coneix com el determinant antigènic majoritari de l'amoxicil·lina, que consisteix en la obertura de l'anell β -lactàmic per l'atac nucleòfil, d'una amina de les proteïnes. Els dos adductes aïllats a pH 4,7 no s'havien descrit fins el moment i, conseqüentment s'han hagut d'elucidar estructuralment. Per dur a terme aquesta tasca s'han utilitzat tres pèptids simplificats anàlegs a una de les sondes peptídiques emprades. Mitjançant l'elucidació estructural dels compostos formats entre aquests pèptids i l'amoxicil·lina s'ha aconseguit fer una proposta de les estructures més probables dels adductes creats a pH 4,6. Tant els antígens com els adductes penicil·línics s'han utilitzat com a determinants antigènics per desenvolupar immunoassaigs per la detecció de IgEs específiques en sèrums de pacients al·lèrgics a penicil·lines. Aquests assaigs s'han desenvolupat en format ELISA i magneto-ELISA. Gràcies a la preconcentració dels sèrums i la eliminació del senyal inespecífic que ofereix el magneto-ELISA, s'ha aconseguit desenvolupar un assaig on totes les mostres dels pacients al·lèrgics han presentat una resposta positiva en front d'alguns dels tres adductes. Alguns dels antígens també han sigut reconeguts utilitzant l'assaig ELISA convencional. Per tal d'avaluar a la vegada antígens i adductes es va traslladar l'assaig al format microarray. Però després de fer grans esforços per incrementar el senyal, optimitzant tots els paràmetres possibles de l'assaig no va ser possible detectar IgEs específiques.

El segon bloc d'aquesta tesi consisteix en prevenir les reaccions adverses a penicil·lines detectant aquests fàrmacs en mostres d'aliments. Per portar a terme aquest segon objectiu es va plantejar desenvolupar un immunoassaig per a la detecció d'amoxicil·lina en mostres de llet. Per això calia prèviament produir anticossos específics contra amoxicil·lina. En un primer moment es van desenvolupar anticossos policlonals de conill utilitzant dos tipus d'immunògens que havien estat dissenyats d'una forma racional. L'immunogen Amx1-PLL estava dissenyat per generar anticossos específics per a reconèixer la part variable de l'amoxicil·lina mentre que l'immunogen Amx2-Br-HCH estava pensat per produir anticossos de família, és a dir, anticossos capaços de reconèixer l'anell β -lactàmic de totes les penicil·lines. La polilisina (PLL) va resultar no ser suficientment immunogènica. Pel contrari l'immunogen Amx2-Br-HCH sí va produir anticossos contra amoxicil·lina. Els antisèrums As218 i As219 van presentar una gran afinitat per tots els conjugats amoxicil·línics produïts, però en canvi molt poca competició per la molècula d'amoxicil·lina. Això va suggerir que una bona part de la població dels anticossos policlonals estaven reconeixent una estructura modificada de la penicil·lina, concretament la seva forma oberta, l'àcid amoxiciloic. Es va aconseguir obtenir una gran detectabilitat per aquest analit, amb valors de IC_{50} al voltant de $0.35 \mu\text{g/L}$, molt per sota dels límits establerts per aquest fàrmac. Per tant, tot i no haver pogut desenvolupar un assaig contra amoxicil·lina en forma tancada, sí s'ha aconseguit un assaig amb molt bons resultats per a detectar amoxicil·lina en forma oberta.

Finalment es va fer un últim intent d'obtenció d'anticossos contra amoxicil·lina produint anticossos monoclonals. Aquests es produeixen aïllant les cèl·lules productores d'anticossos o limfòcits B, i clonant aquests amb cèl·lules tumorals immortals. Els híbridomes resultants s'aïllen individualment, i cadascun d'aquests és capaç de crear una immunoglobulina diferent. Tot i l'esforç emprat en aquesta via, no va ser possible aïllar cap clon productor i per tant no es van poder produir anticossos monoclonals específics contra amoxicil·lina.

INTRODUCCIÓ



1. Introducció

1.1. Reaccions adverses a fàrmacs

1.1.1. Definició

La definició de reaccions adverses a fàrmacs (RAF) ha variat al llarg dels anys. La definició que va donar la OMS (Organització Mundial de la Salut) i que s'ha fet servir durant més de 30 anys és que una RAF és una resposta nociva i involuntària a un fàrmac que es produeix amb dosis normals a humans amb el fi de prevenir, diagnosticar, tractar malalties o per a modificar funcions fisiològiques [1]. Tot i això, aquesta definició deixa de banda aquells efectes minoritaris que no es poden considerar nocius però que són produïts per fàrmacs de manera no desitjada. Per aquest motiu la definició d'en Laurence [2] especifica de manera explícita aquest tipus d'efectes dient que una RAF és un efecte no desitjat causat per un fàrmac subministrat a una dosi normal per a efecte terapèutic (preventiu o de diagnòstic) que causa la reducció de la dosi terapèutica en futurs subministraments o la retirada del fàrmac del mercat, a més de predir riscos d'administració. Tot i això, aquestes definicions exclouen els errors com a font dels efectes adversos [3], com per exemple, contaminants o excipients que se suposen inactius. Així doncs, cal incloure el medicament i no només el principi actiu dins de la definició de les reaccions adverses.

L'any 2000, Edwards i Aronson [4], van donar una nova definició especificant que una RAF és una reacció no desitjada o perjudicial, resultant de la intervenció relacionada amb l'ús de productes mèdics, que prediu riscos en futures administracions i garanteix la prevenció o tractaments específics, o alteracions de les dosis, o la retirada del producte del consum humà.

El terme "efecte advers" es preferible a altres termes com "efectes tòxics" o "efectes secundaris". Un efecte tòxic està relacionat amb la dosi subministrada mentre que un efecte

secundari pot ser o no dosi dependent i, segons la OMS està relacionat amb les propietats farmacològiques del fàrmac [3]. Per tant, aquesta definició està oberta a incloure efectes secundaris que poden ser tan beneficiosos com perjudicials. A més a més, un efecte pot ser o no causat per l'acció farmacològica per la qual el fàrmac ha estat dissenyat. Es per això, que el terme "efecte advers" engloba millor el significat d' efectes no desitjats, sense fer referència a mecanismes d'acció, evitant les ambigüitats i els riscos de classificacions errònies.

1.1.2. Classificació

Els precursors de la farmacologia moderna van distingir entre reaccions adverses a fàrmacs dosi-dependent i no-dosi-dependent, anomenades de tipus A i B respectivament [5]. Més endavant es van afegir dos nous tipus de reaccions adverses: reaccions relacionades amb la dosi i el temps simultàniament, tipus C, i reaccions retardades o tipus D[6, 7]. La última d'aquestes categories ha estat dividida en dos tipus: reaccions temps-dependents i d'efectes d'abstinència. Més recentment, s'ha proposat una sisena categoria: teràpies de fracàs inesperat. A la **Taula 1.1.** es descriuen els 6 tipus de RAF i les seves característiques més importants.

Taula 1.1. Classificació de les reaccions adverses a fàrmacs.		
Tipus de reacció	Característiques	Respostes
A: Dosi-dependent	<ul style="list-style-type: none"> · Comú · Relacionat amb una acció farmacològica del fàrmac. · Previsible · Baixa mortalitat 	<ul style="list-style-type: none"> · Efectes de toxicitat · Efectes secundaris
B: No-dosi dependent	<ul style="list-style-type: none"> · Poc comú · No està relacionat amb un efecte farmacològic · Imprevisible · Elevada mortalitat 	<ul style="list-style-type: none"> · Reaccions immunològiques · Reaccions idiosincràtiques
C: Temps- i dosi-dependent	<ul style="list-style-type: none"> · Poc comú · Relacionat amb la dosi acumulada 	<ul style="list-style-type: none"> · Supressió de l'hipotàlam -hipòfisi-suprarrenal per corticosteroides
D: Retardades	<ul style="list-style-type: none"> · Poc comú · Ocasionalment dosi-dependent · Succeeix un temps més o menys llarg després de l'ús del fàrmac 	<ul style="list-style-type: none"> · Teratogènesis · Carcinogènesis
E: Abstinència	<ul style="list-style-type: none"> · Poc comú · Succeeix poc després de la retirada del fàrmac 	<ul style="list-style-type: none"> · Síndrome de l'abstinència d'opiacis
F: Teràpia de fracàs inesperat	<ul style="list-style-type: none"> · Comú · Dosi-dependent · Sovint causat per interaccions del fàrmac 	<ul style="list-style-type: none"> · La dosificació inadequada d'un anticonceptiu oral, especialment quan s'utilitza juntament amb inductors enzimàtics específics

1.1.2.1. Tipus B: reaccions adverses a fàrmacs de tipus idiosincràtic

El terme idiosincràtic significa “a un individu”, per tant, una reacció idiosincràtica (RIF) és una reacció adversa i individual a fàrmacs dins de les dosis utilitzades normalment en medicina i a més, no està relacionada amb els efectes farmacològics de cada fàrmac [8]. Aquest tipus de reaccions es poden conèixer amb el nom de reaccions adverses de tipus B, reaccions d’hipersensibilitat o reaccions al·lèrgiques. Una característica molt important en aquests tipus de reaccions és el temps de retard entre el primer cop que es pren un fàrmac i el començament pròpiament dit de la reacció al·lèrgica [9]. Hi ha pocs exemples en que la RIF es doni instants després que la primera dosi del fàrmac hagi estat subministrada [10, 11]. Tanmateix, en la gran majoria dels casos, el retard des de la primera ingesta del fàrmac fins el començament de la reacció idiosincràtica sol ser d’una setmana o més. El retard és diferent en funció del tipus de RIF o de la naturalesa del fàrmac. Per contra, el temps de retard per a persones que ja han estat exposades prèviament a un fàrmac pot arribar a ser molt curt, i fins i tot, es poden donar xocs anafilàctics en qüestió de minuts. Aquest fenomen es coneix com a sensibilització prèvia del fàrmac.

En molts casos, quan un pacient desenvolupa una reacció idiosincràtica a un fàrmac pot augmentar el risc de patir una altra RIF cap a un altre fàrmac. Un clar exemple són les RIF associades a fàrmacs com el fenitoïna, la carbamazepina i el fenobarbital. Si un pacient té una RIF a un d’aquests fàrmacs, el risc de patir una reacció adversa similar a un altre fàrmac és aproximadament del 40%-60% [12, 13]. Això es coneix com a sensibilitat creuada, si el pacient comença una nova RIF amb algun fàrmac similar, el temps d’inici de la RIF segurament és retardat i no requereix una sensibilització prèvia del propi fàrmac. Això suggereix que els mecanismes d’actuació són similars però que el reconeixement immune (presumptament les cèl·lules T específiques del fàrmac) és diferent. En canvi, per poder parlar de reactivitats creuades, les mateixes cèl·lules T específiques han de ser responsables de reconèixer ambdós fàrmacs de la mateixa manera, però això no és tant freqüent. En aquest cas les estructures químiques dels fàrmacs han de ser molt similars, com per exemple fàrmacs de la mateixa família.

En general, hi ha algunes característiques comunes per a moltes de les RIFs que es coneixen, però també hi ha moltes diferències significatives. Això evidencia diversos i únics mecanismes d’actuació que compliquen molt l’estudi i la comprensió d’aquestes respostes. Moltes d’aquestes característiques, com la resposta immediata després d’una segona exposició al fàrmac o la presència d’anticossos específics contra el fàrmac suggereixen

mecanismes d'actuació immunològics. No obstant això, la absència d'aquestes característiques no prova el contrari. Desafortunadament, les característiques clíniques de les RIF no són suficients per establir un mecanisme robust d'actuació.

a. Possibles mecanismes d'actuació de les RIF

Tot i que la gran majoria dels mecanismes que causen les RIFs són desconeguts, moltes de les hipòtesis proposades apunten a que són de tipus immunològic. A més a més, hi ha una gran quantitat de evidències que suggereixen que els metabòlits químicament reactius dels fàrmacs són els responsables de moltes RIFs [10].

- **Hipòtesi de l'haptè**

L'any 1935, Landsteiner va publicar que no es podia induir una resposta immune amb una molècula petita a no ser que aquesta molècula petita fos químicament reactiva i es pogués unir a una proteïna [6, 12, 14]. Aquestes petites molècules les va anomenar haptens. La hipòtesi segueix la clàssica teoria que les proteïnes endògenes són modificades pel fàrmac o un metabòlit d'aquest, i el complex resultant és reconegut. Aquests concepte es basa en que el sistema immunològic aprèn a diferenciar "propi" de "estrany" responant amb tolerància al propi i activant el sistema immunològic contra tot allò que no reconeix [15].

El mecanisme immunològic és el següent, els conjugats fàrmac-proteïna han de ser absorbits per les cèl·lules presentadores d'antígens, com els macròfags o les cèl·lules dendrítiques (CPAs), processats (en petits fragments), i presentats mitjançant els complexos majors de histocompatibilitat (CMH) a les cèl·lules T o limfòcits T. El reconeixement d'aquest fragment per les cèl·lules T s'anomena senyal 1. La **Figura 1.1.** il·lustra la hipòtesi de l'haptè. El primer mecanisme de RIF que es va estudiar amb detall fou el de les reaccions al·lèrgiques a penicil·lines [16]. Es va trobar que l'anell de la β -lactama de la penicil·lina reaccionava de manera irreversible amb els grups amino o tiols lliures de les proteïnes. En alguns pacients, això generava una reacció immunològica contra l'adducte penicil·lina-proteïna, i si la producció d'anticossos IgE era suficient, podia generar-se una forta resposta al·lèrgica contra el propi fàrmac com ara l'anafilaxi.

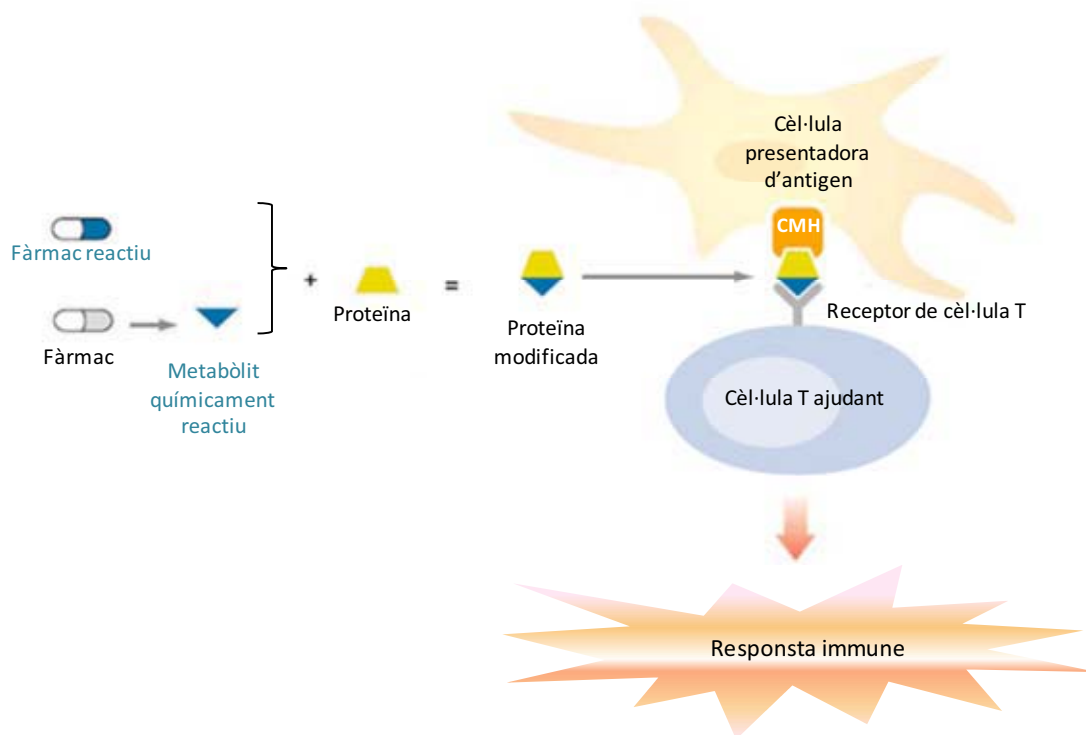


Figura 1.1. La hipòtesi de l'haptè. El fàrmac o un metabòlit reactiu d'aquest s'uneix a una proteïna endògena (generalment HSA) fent que sigui reconeguda com a estranya per les cèl·lules presentadores d'antígens. El complex és processat i els pèptids modificats amb el fàrmac es presenten mitjançant el complex major d'histocompatibilitat a les cèl·lules T o limfòcits T ajudants. El reconeixement de l'antigen processat per les cèl·lules T receptores es coneix com la senyal 1 i genera la resposta immune.

- **Hipòtesi del perill**

L'any 1987 la hipòtesi que prevalia fou la hipòtesi de propi o estrany [17]. En aquest context, el sistema immunològic tolera tot allò que considera propi i genera una resposta contra tot allò que considera estrany. Els mecanismes que estableixen la tolerància al que es considera propi són mecanismes que es desenvolupen poc després del naixement. Polly Matzinger va desafiar aquesta hipòtesi clàssica de la immunologia [18]. Ella va argumentar que, en general, les proteïnes externes per sí soles no generen una resposta immune significativa i per tant que es necessita la presència d'un adjuvant que estimuli les cèl·lules presentadores d'antigen (CPA). A més, hi ha proteïnes que no s'expressen fins a un posterior desenvolupament de l'individu, com per exemple durant la pubertat o l'embaràs, i no per això generen una resposta immune. També, va argumentar que és ineficient generar una resposta contra alguna cosa que no està causant una lesió o un perill contra l'organisme. La seva alternativa, la hipòtesi del perill, consisteix en que només les cèl·lules en perill de lesió poden generar senyals d'alerta per tal d'estimular el sistema immunològic. Així doncs, a més de la

senyal 1 mencionada anteriorment, les cèl·lules T han d'estar coestimulades per l'activació de les CPAs. Això està mediat per interaccions entre molècules coestimuladores, i es coneix com la senyal 2. Per exemple, el fragment molecular B7 d'una cèl·lula presentadora ha d'interaccionar amb el fragment CD28 d'un limfòcit T. Per tant, per activar el sistema immunològic es necessiten que simultàniament es generin els dos senyals. En aquesta hipòtesi, es suggereix que hi hagi un senyal de perill procedent d'una cèl·lula estressada, la qual estimula a les CPAs, i consegüentment condueix a la regulació de les molècules coestimuladores. No es coneixen quines són aquestes senyals de perill, però semblen ser endògenes i diferents en funció del tipus de cèl·lula que estigui estressada. Sent aquesta la hipòtesi correcta, òbviament un factor determinant en la resposta immune hauria de ser la naturalesa del teixit que està sent afectat [19]. La hipòtesi del perill aplicada a les RIF s'il·lustra a la **Figura 1.2**. Es coneix que algunes infeccions virals augmenten el risc de patir una RIF, però no és un efecte universal. A més, no totes les infeccions víriques afecten el sistema immune de la mateixa manera.

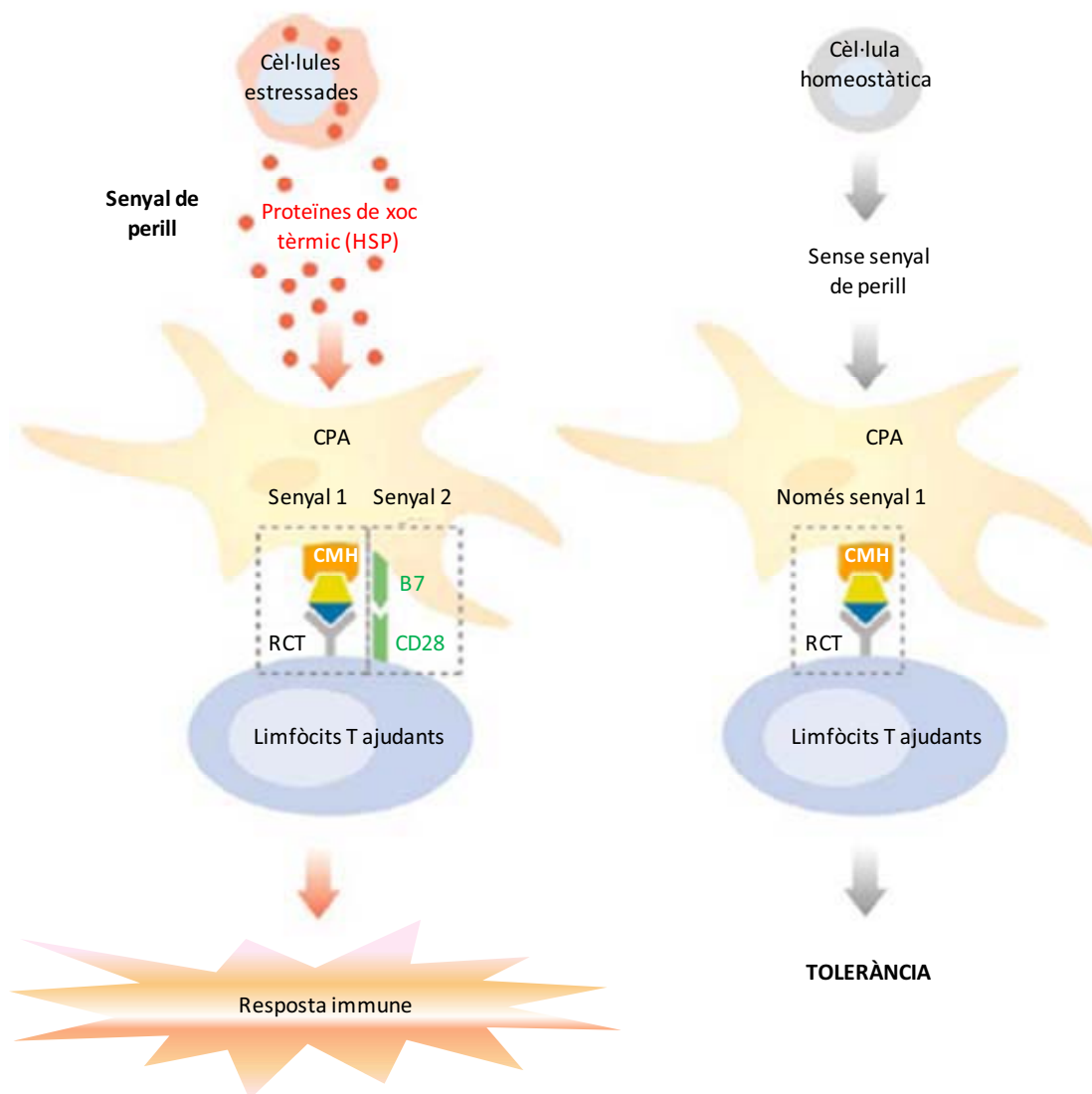


Figura 1.2. Hipòtesi del perill. Les cèl·lules estressades segreguen senyals de perill com augment de temperatura, canvis de pressió osmòtica que estimulen les proteïnes de xoc tèrmic. Aquests senyals activen les cèl·lules presentadores d'antígens (CPA), les quals indueixen les proteïnes de xoc tèrmic (HSP) a la generació de molècules coestimuladores com la B7. La coestimulació dels limfòcits T a través d'interaccions entre les CPAs, com per exemple entre B7 i CD28, és el que s'anomena el senyal 2. En absència d'aquest senyal, la resposta és de tolerància. Es coneix que el senyal 2 és necessari per a generar la resposta immune, i això s'ha d'incorporar en una hipòtesi completa; l'aportació de la hipòtesi del perill és que hi ha una activació de les CPAs a i a més una regulació d'aquesta amb molècules coestimuladores.

- **Hipòtesi de la interacció farmacològica**

Pichler i col·laboradors van generar clons de limfòcits T de pacients amb un historial de RIFs a fàrmacs específics, i van trobar que aquests limfòcits proliferaven en presència del fàrmac en qüestió sense metabolitzar [20]. Ell va proposar que molts fàrmacs s'unien reversiblement amb el complex major d'histocompatibilitat de les cèl·lules presentadores

d'antígens, generant un superantigen, i això podia generar una resposta immune i en alguns casos una RIF. Ell es va referir a aquest fet com la hipòtesi de la interacció farmacològica [21], la qual s'il·lustra a la **Figura 1.3**. Aquesta hipòtesi fa referència al senyal 1, però igual que la hipòtesi de l'haptè, no té en compte el senyal 2.

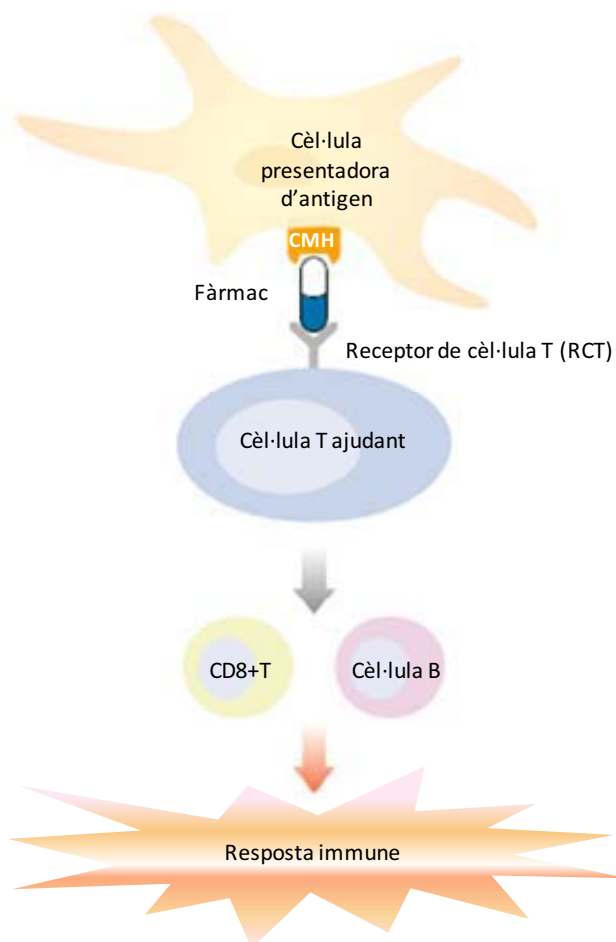


Figura 1.3. Hipòtesi de la interacció farmacològica. El fàrmac s'uneix directament al complex CMH-RCT, generant un senyal 1 i una resposta immune al fàrmac original. Aquesta hipòtesi no fa referència al senyal 2.

La sulfametoxazola, antibiòtic de la família de les sulfonamides, va ser el fàrmac més estudiat a la hora de verificar aquesta hipòtesi. En la seva estructura, aquest compost té un grup anilina. Teòricament, tots els fàrmacs amb una amina aromàtica subministrats a unes dosis iguals o majors a 10 mg/dia estan associats a efectes de RIFs independentment de l'estructura del fàrmac [22]. Això es degut a que l'amina primària es pot oxidar generant un metabòlit reactiu, el grup nitrós. Aquest grup reacciona fàcilment amb els grups tiols de les proteïnes formant el complex fàrmac-proteïna.

A la **Figura 1.4**, es descriuen les tres vies possibles d'activació d'una RIF per part de la sulfametoxazola, com són l'activació intracel·lular, l'activació no metabòlica i l'activació

extracel·lular [23]. Diversos estudis mostren que els mecanismes inicials de sensibilització contra aquest fàrmac serien els abans explicats, els quals generen el senyal 1. L'activació té lloc extracel·lularment, es genera un metabòlit reactiu el qual s'uneix a una proteïna citoplasmàtica, i aquest complex és processat per la CPA. Al ser la primera vegada que es dona aquest mecanisme, encara no s'ha generat cap senyal de perill. La següent vegada és quan s'indueixen les molècules relacionades amb el senyal 2. Aquest fet se li suma que s'ha obtingut una memòria immunològica provinent de la prèvia sensibilització i és quan s'activa el procés immunològic. En el cas concret d'una segona ingesta del fàrmac, aquest ja no cal ser processat com la primera vegada. S'han postulat altres mecanismes més directes, com l'activació intracel·lular dins la cèl·lula CPA o la interacció directa d'aquest amb el propi CMH mitjançant una activació no metabòlica. Els autors no s'acaben de posar d'acord en quin és el mecanisme que activa la resposta immune, però tots coincideixen en que el mecanisme de sensibilització ha de ser diferent que el mecanisme final immunològic.

Però no tots els fàrmacs es comporten igual. Sembla ser que el ximelagatran i possiblement també la lamotrigina [24] no generen metabòlits reactius. El ximelagatran, un anticoagulant ampliament emprat a nivell mundial, sembla que pot generar una resposta immune a través d'un mecanisme d'interacció farmacològic, ja que hi ha evidències que s'uneix directament i reversiblement amb el CMH [25].

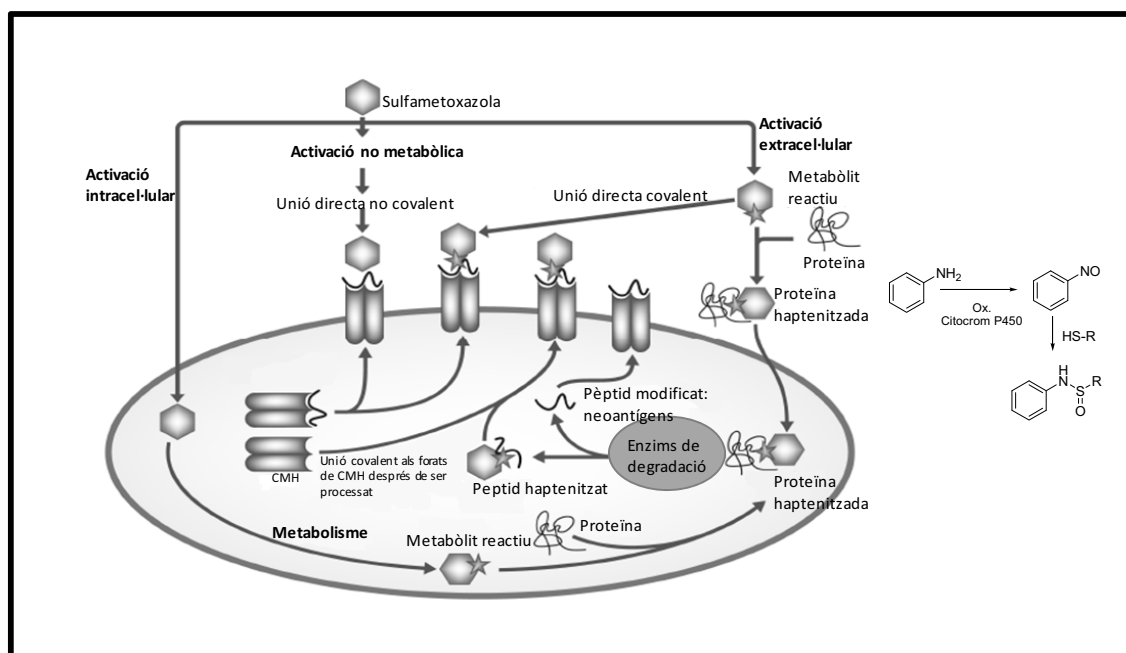


Figura 1.4. Tres vies possibles de presentació de la sulfametoxazola per part d'una CPA [26].

- **Hipòtesi no-immune**

Hi ha evidències que la gran majoria de les RIFs funcionen a través de mecanismes de tipus immune. Tot i això, és probable que algunes RIFs no estiguin mediatades immunològicament, però saber exactament quina fracció de RIFs transcorren a través de mecanismes no immunes és pràcticament impossible avui dia. Tampoc es pot fer una clara diferenciació entre mecanismes immunes i no immunes ja que un agent citotòxic pot causar danys cel·lulars que provoquin una resposta immune, i la resposta immune pot contribuir al dany causat per l'agent citotòxic. Per exemple, l'acetaminofen o paracetamol es considera que genera RIFs de tipus citotòxic, però tot i això, hi ha evidències que el sistema immune (cèl·lules Kupffer, NK T i citoquines) s'activa quan hi ha problemes de toxicitat provocats per aquest fàrmac [27, 28].

Un dels exemples de RIF que probablement tinguin un origen no immune són les reaccions de tipus hepàtiques. Zimmerman va classificar les RIFs hepàtiques que no estaven relacionades ni amb febre ni amb erupcions cutànies com idiosincràsies metabòliques, tot i que no hi ha exemples demostrables que algun altre camí metabòlic desconegut sigui responsable de la naturalesa idiosincràtica d'aquest tipus de reaccions [29]. Hi ha moltes reaccions mediatades immunològicament que no presenten febres o erupcions cutànies, i per tant, aquest criteri és una mica feble. Tot i això, moltes de les reaccions classificades com d'idiosincràsies metabòliques no apareixen a temps inferiors després de la primera exposició. El fet de que no aparegui una ràpida reacció en reexposicions pot portar a pensar que no hi ha limfòcits T de memòria, característiques de les reaccions immunes. Però tot i això el temps de reexposició no és un paràmetre suficientment fiable per establir quan una RIF està o no mediada immunològicament.

Recentment, es va trobar que l'hepatotoxicitat produïda pel ximelagatran a vegades no es manifestava en segones exposicions del fàrmac, tot i que aquest fàrmac s'associava al genotip LAH específic (LAH és l'acrònim per a l'antigen limfocitari humà, i és la versió humana del CMH) [25]. La hipòtesi principal és que una RIF contra aquest fàrmac està associada a una reacció immune, però la falta de resposta en les reexposicions no es pot explicar a no ser que hi hagi una inducció a una tolerància immune. Hi ha molts exemples de RIFs que no poden ser classificades. Un altre exemple, és la hepatotoxicitat induïda per la toglitazona, classificada com una idiosincràsia metabòlica, que recentment s'ha trobat que està relacionada amb autoanticossos [30] i amb danys mitocondrials [31].

b. Determinants genètics de les RIFs

Es probable que els factors genètics també estiguin implicats en la naturalesa idiosincràtica de les RIFs. Tot i que s'hagin observat relacions entre polimorfismes en metabolismes de fàrmacs no s'han pogut demostrar. S'han trobat algunes associacions amb els genotips LAH específics de diversos individus i determinats fàrmacs, suggerint que pot haver-hi un mecanisme immune regulat genèticament. Un exemple són les hipersensibilitats induïdes per l'abacavir que estan fortament associades al genotip HLA-B*5701 i en menor mesura a la variació haplotípica Hsp70-Hom [32]. En la China, hi ha una forta associació entre el genotip HLA-B*1502 i la necrosi epidèrmica induïda per la carbamazepina [33] igual que amb la HLA-B*5801 i la necrosi epidèrmica induïda per l'al·lopurinol [34]. Aquesta associació, en canvi, pel que fa a carbamazepina, no es va observar en la població Europea [35]. En la gran majoria de casos, no s'han trobat associacions robustes, i com en el cas de les malalties mediades immunològicament com la diabetis de tipus I, els determinants són poligènics [36].

En l'actualitat, aquestes hipòtesis mecanístiques són simplement hipòtesis de treball. Les hipòtesis no són excloents entre elles, ja que, un metabòlit reactiu pot actuar com un haptè i un senyal de perill i un limfòcit T pot reconèixer un fàrmac original o el seu metabòlit. A més, el sistema immune pot jugar un paper en el dany causat pels agents citotòxics. En conclusió, el més probable és que simultàniament diversos mecanismes estiguin involucrats en una RIF específica. Tot i que, les característiques clíniques donen informació sobre quin tipus de mecanisme està involucrat en cada cas, es fa necessari millorar les metodologies analítiques per poder comprendre millor els veritables mecanismes de cadascuna de les RIFs.

1.1.2.2. Síntomes clínics de les RIFs

Hi ha una gran varietat de símptomes clínics que poden aparèixer arrel d'una reacció idiosincràtica provocada per fàrmacs. En l'**Annex 1** hi ha una breu definició de cadascun d'aquests símptomes i a la **Taula 1.2.** es presenten els més comuns:

Taula 1.2. Taula resum dels símptomes clínics més habituals de les RIFs.			
Símptomes clínics	Descripció	Exemple de fàrmacs que ho poden provocar	Referència
Erupcions a la pell			
Urticària/anafilàxia	<ul style="list-style-type: none"> Poden ser de caire immunològic o no Són respostes poc habituals 	fàrmacs β-lactàmics	[37-41]
Exantemàtica o erupcions maculopapulars	<ul style="list-style-type: none"> Comprenen el 95 % de totes les erupcions provocades per fàrmacs 	Al·lopurinol, penicil·lins, cefalosporines, antiepilèptics i sulfonamides	
Exantema fix medicamentós	<ul style="list-style-type: none"> Sempre es localitzen al mateix lloc, i en reexposicions pot augmentar el número de llocs Els llocs més comuns són les membranes mucoses (llavis o genitals externs) 	Tetraciclins, NSAIDs i carbamazepina	[37, 42]
Eosinofília i símptomes sistèmics (DRESS)	<ul style="list-style-type: none"> Erupció severa i febre, limfadenopatia, artràlgia i pot involucrar el fetge, els ronyons, pulmons, tiroides, medula òssia i cervell (menys habitual) 	Carbamazepina, fenitoin, sulfonamides, minociclins, al·lopurinol, sals d'or i dapsona	[37, 43]
SJS (Síndrome de Stevens-Johnson) i TEN (necròlisi epidèrmica tòxica)	<ul style="list-style-type: none"> Síndromes molt similars, però el TEN és més sever (involucra el 30 % de la pell) Estan involucrades les membranes mucoses i apareixen ampolles que generen desprendiment de la pell 	Sulfonamides, anticonvulsionants, NSAIDs i al·lopurinol	
Lesions hepàtiques	<ul style="list-style-type: none"> La reacció més habitual és la necrosi hepàtica (caracteritzat per un augment de l'alaninamintransferasa) També pot aparèixer lesions colèstàtiques Poden ser de caire immune o metabòliques 	àcid para-aminosalacilic, sulfonamides, fenotiazines, nitrofurantoina, bleomicina i metotrexat	[44, 45]
RIFs hematològiques	<ul style="list-style-type: none"> Poden provocar trombocitopènia, agranulocitosi i anèmia aplàsica 	Penicil·lins, quinina, sulfonamides i pirazolones	
Lupus i síndromes autoimmunes	<ul style="list-style-type: none"> Diversitat de síndromes autoimmunes 	Procaïnàmid i hidralazina majoritàriament. També penicil·lamina, minociclina, propiltiouracil, isoniazida i carbamazepina	[46-48]

1.2. Sistema immunològic

La immunologia és la ciència que estudia els processos moleculars i cel·lulars implicats en la defensa de la integritat biològica de l'organisme a través de la identificació de les substàncies pròpies i detecció de les substàncies estranyes i la seva destrucció. En cada organisme, els mecanismes de defensa són molt diversos i heterogenis, tot i que sempre existeix una actuació integrada de tots ells (**Figura 1.5.**).

Els mecanismes de defensa poden ser de tipus inespecífics o específics. Els mecanismes de tipus inespecífics estan construïts per les barreres naturals tals com la pell, mucoses i altres que estan constantment protegint l'individu de contagis externs. Altres elements naturals d'actuació són els lisosomes de la saliva, llàgrimes i secrecions nasals que tenen la capacitat de trencar la unió entre sucres de les parets bacterianes, el que pot induir la seva lisi. També entre aquests mecanismes inespecífics es troba la resposta immune inespecífica. S'entén per resposta immune tots aquells esdeveniments desenvolupats pel sistema immune amb la finalitat de defensar la integritat biològica de l'individu en front de qualsevol agressió (estímul antigènic). La resposta immune pot ser doncs, de tipus inespecífica o innata i de tipus específica.

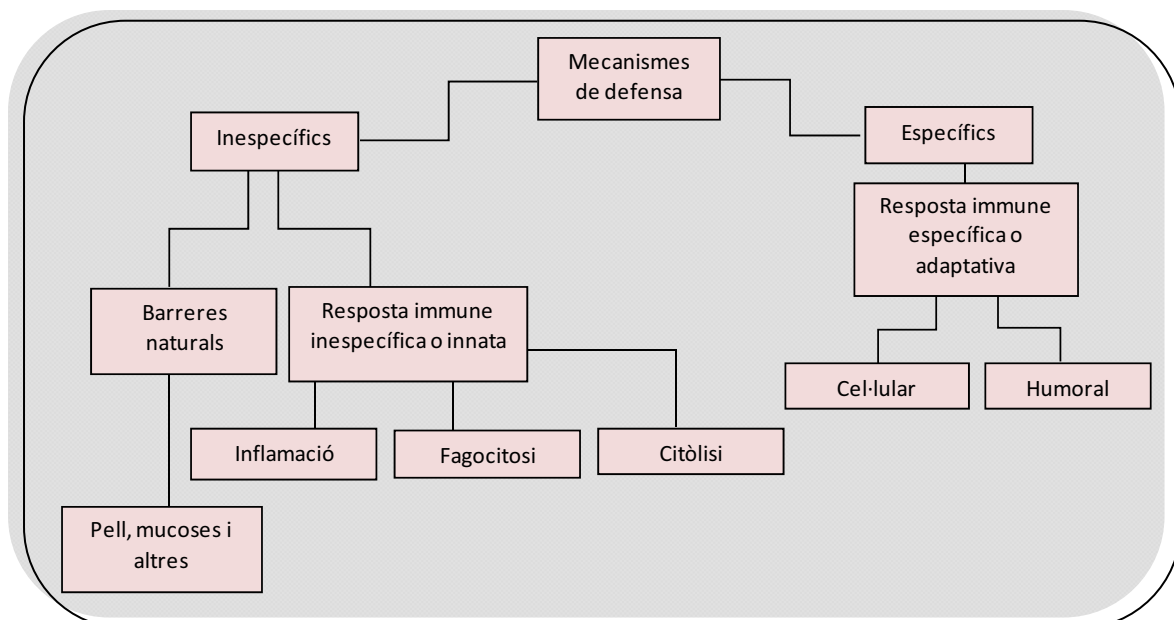


Figura 1.5. Representació dels diferents mecanismes de defensa immunològics.

1.2.1. Resposta immune inespecífica

La resposta inespecífica forma part dels mecanismes inespecífics de defensa i representa el primer sistema defensiu de l'organisme. És molt important aquest sistema enfront la protecció de l'organisme davant infeccions i càncer. Les cèl·lules involucrades en aquests tipus de resposta són els neutròfils, macròfags i cèl·lules NK. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per activar-se de manera immediata sempre que qualsevol substància estranya entri en l'organisme, com succeeix quan hi ha una ferida. En aquest cas totes les cèl·lules es mobilitzen cap al focus, reconeixen i prenen contacte amb aquesta substància estranya, i ho destrueixen mitjançant processos de fagocitosi i citotoxicitat natural.

En aquest tipus de resposta participa també el sistema del complement (C), format per una gran varietat de proteïnes que es troben al plasma. Els diferents components d'aquest sistema actuen en cascada bioquímica, interactuen en un determinat ordre per portar a terme la seva acció en la defensa de l'organisme. Probablement la fagocitosi és el principal element que actua en aquest tipus de resposta. La fagocitosi es porta a terme en diferents fases, aproximació, fagocitosi i lisi.

Els mecanismes de defensa inespecífics aporten un bon sistema de protecció, però en moltes ocasions no són suficients per defensar eficaçment l'organisme.

1.2.2. Resposta immune específica

La resposta immune específica es caracteritza perquè és efectiva contra aquells antígens en front dels quals s'ha iniciat i desenvolupat. Aquest tipus de resposta està mediada principalment pels limfòcits, a més d'altres cèl·lules com les dendrítiques, els macròfags, etc. Els limfòcits són de dos tipus: limfòcits B i T. Els limfòcits T poden ser col·laboradors (Th), citotòxics (Tc) i supressors/reguladors (Ts).

La resposta immune específica es considera que pot ser de dos tipus: humoral i cel·lular[49]. Tot i que la separació entre els dos tipus de resposta és més de caire didàctic que real, en general es considera que quan els elements implicats són els limfòcits B es tracta d'una resposta de tipus humoral, i quan participen majoritàriament els limfòcits T es tracta d'una resposta cel·lular.

1.2.2.1. Reconeixement de l'antigen

Per a que s'iniciï una resposta immune específica, es requereix el reconeixement de l'antigen per part dels limfòcits i la posterior activació d'aquests. Els limfòcits B reconeixen l'antigen mitjançant immunoglobulines de membrana (IgM) mentre que els limfòcits T ho fan mitjançant receptors de limfòcits T (RCT) (**Figura 1.6.**).

L'activació dels limfòcits B condueix a la síntesi d'immunoglobulines mentre que quan els que s'activen són els limfòcits Th o Tc tenen com a funció prioritària la producció de missatgers químics (limfocines) i la lisi cel·lular, respectivament.

Les immunoglobulines (Ig) són glicoproteïnes formades, al menys, per quatre cadenes polipeptídiques, mentre que el receptor dels limfòcits T (RCT) és també una glicoproteïna però tan sols de 2 cadenes. Ambdues molècules tenen la propietat de reconèixer i unir-se a l'antigen específicament.

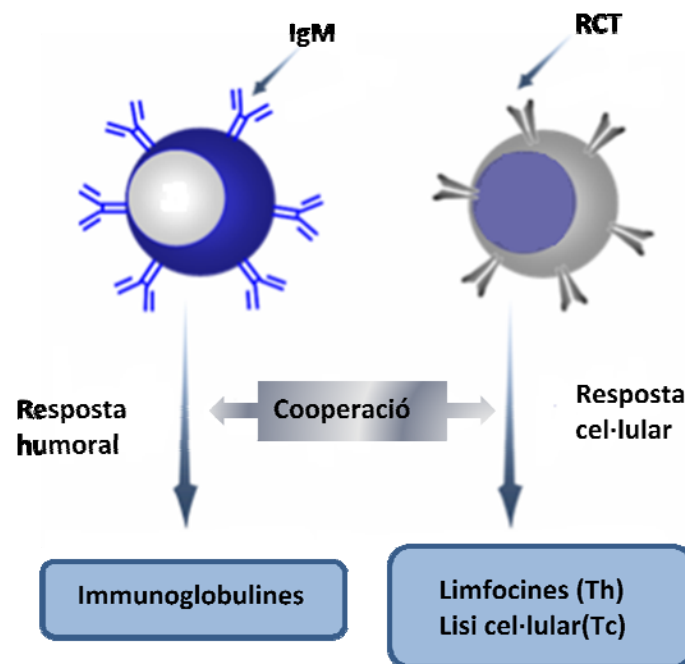


Figura 1.6. Els limfòcits B i T reconeixen l'antigen mitjançant estructures polipeptídiques diferents.

1.2.2.2. Interacció cel·lular

Per a que l'activació de l'antigen es doni es requereix que prèviament s'hagi produït la interacció entre les cèl·lules presentadores i les cèl·lules col·laboradores. Com s'ha explicat anteriorment a l'apartat 1.1.2.1.a, aquest fenomen succeeix principalment mitjançant

molècules d'adhesió, les quals són un grup molt heterogeni de substàncies que es troben a la superfície de les cèl·lules presentadores i cèl·lules col·laboradores, i que fan possible la unió entre el receptor de les cèl·lules (RCT) T i el complex MHC-Antigen de les cèl·lules presentadores de l'antigen (CPA). Tant les molècules d'adhesió que produeixen el senyal 1 com les que produeixen el senyal 2 participen en tot moment de la interacció cel·lular entre la resposta cel·lular i la resposta humoral.

1.2.2.3. Immunomoduladors de la resposta immune

La resposta immune es regula per molècules conegudes com limfocines, que són substàncies produïdes per limfòcits en resposta a una gran varietat d'estímuls i que són capaces de regular el funcionament d'altres cèl·lules del sistema immune. Les limfocines actuen com a senyal complementaria facilitant l'activació, proliferació i diferenciació dels limfòcits i en general de totes les cèl·lules implicades en la resposta immune.

1.2.2.4. Resposta immune cel·lular

Tot i que existeixen excepcions, la separació de les funcions dels limfòcits Th i Tc ve donada per l'origen dels antígens que reconeixen. Els limfòcits Tc reconeixen als antígens presentats en superfície per molècules CMH de classe I, mentre que els limfòcits Th interaccionen amb l'antigen en el context de molècules CMH de classe II.

Associats a les dues cadenes polipeptídiques polimòrfiques que constitueixen el RCT es troba un grup de molècules monomòrfiques de membrana anomenades col·lectivament CD3, formant així el complex RCT/CD3 i que se sap que és imprescindible per a la transmissió de la senyal del reconeixement antigènic a l'interior cel·lular. En conseqüència es desencadena una cascada de reaccions bioquímiques en el citoplasma de la cèl·lula T, donant pas al procés d'activació, proliferació i diferenciació cel·lular. Aquests mecanismes impliquen la participació d'una sèrie de substàncies intracitoplasmàtiques, conegudes com segons missatgers. Com a conseqüència d'aquests esdeveniments es produeix finalment la transcripció dels gens implicats en la síntesi de proteïnes i factors implicats en una determinada funció. L'activació de les cèl·lules Th és el nucli central de la resposta cel·lular, ja que aquestes actuen sobre macròfags, cèl·lules NK i limfòcits Tc. Aquestes cèl·lules adquireixen la capacitat de lisar les cèl·lules que porten l'antigen que ha induït la seva activació.

1.2.2.5. Resposta immune humoral

L'absència d'aquest tipus de resposta deixa l'individu tant indefens davant tota classe de gèrmens patògens i altres agressions que és incompatible amb la vida si no s'instaura a temps un tractament adequat. En la resposta immune humoral intervenen els limfòcits B, que com s'ha dit anteriorment, reconeixen l'antigen a través de les immunoglobulines de membrana. De totes maneres, aquest estímul no és suficient per a que s'iniciï i es desenvolupi la resposta immune humoral. Per a que això succeeixi és necessari que els limfòcits B, a més de l'estímul antigènic, obtingui l'estímul de certes citosines produïdes pels limfòcits T col·laboradors. Només quan es troben tots aquest estímuls és produeix l'activació, proliferació i diferenciació dels limfòcits B fins a la formació de cèl·lules de memòria i cèl·lules plasmàtiques productores d'immunoglobulines, que seran l'element efector final de la resposta humoral. En la **Figura 1.8.** s'observa una visió general de la resposta immune.

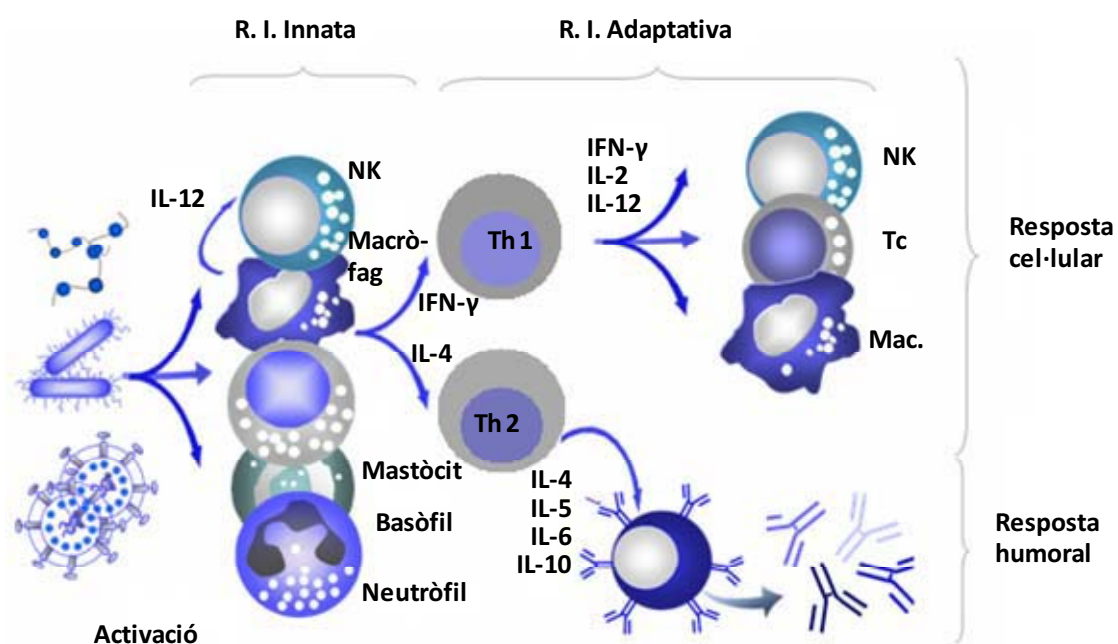


Figura 1.8. Els macròfags participen tant en la resposta immune innata com adaptativa, i junt amb els Tc i cèl·lules NK formen part del sistema citolític efector del sistema immune.

1.2.2.6. Característiques de la resposta immune específica

La resposta immune específica es caracteritza per ser de caràcter clonal, reconèixer uns antígens i d'altres no (especificitat), desenvolupar memòria i ser autoregulable.

Especificitat. Cada antigen estimula només aquell limfòcit o grup de limfòcits pel qual han sigut desenvolupats, i en conseqüència posseeixen en la seva membrana els receptors capaços de reconèixer i unir-se específicament a ell. Aquests receptors, tal i com s'ha indicat anteriorment, són immunoglobulines de superfície quan es tracta de limfòcits B o el RCT quan es tracta de limfòcits T.

Clonalitat. Quan un limfòcit o un grup de limfòcits és activat, aquest prolifera i es diferencia en diverses cèl·lules derivades, totes elles amb idèntics receptors de superfície. Es diu que totes aquestes cèl·lules constitueixen el clon cel·lular. Tan l'especificitat com la clonalitat de la resposta immune van ser originalment definits als anys 50 i es coneix com la teoria de selecció clonal de Burnet. Aquesta teoria diu que cada antigen estimula aquell limfòcit o grup de limfòcits que posseeixen en la seva membrana receptors capaços de reconèixer i unir-se específicament a ell i com a conseqüència es produeix la seva proliferació i diferenciació en cèl·lules amb les mateixes característiques de reconeixement que els limfòcits originals. Aquest caràcter clonal implica una gran eficiència, ja que cada individu només posa en marxa aquells elements cel·lulars i moleculars que li son necessaris per a una determinada acció.

Memòria immunològica. Una altra característica important d'aquest tipus de resposta és que l'organisme manté memòria d'un estímul concret. Això es deu a la permanència de limfòcits de llarga vida després d'haver estat estimulats prèviament per un antigen.

Autoregulació. Aquest tipus de resposta disposa de mecanismes interns de control, de tal manera que la intensitat de la resposta es regula per l'acció de diversos tipus de molècules com les immunoglobulines i sobre tot les citosines.

1.2.3. Resposta primària i secundària

Un cop l'antigen entra en contacte amb l'organisme es produeix una resposta que s'anomena primària. Pel contrari, quan després d'un temps el mateix antigen torna a activar el sistema immune, es produeix una resposta que s'anomena secundària o adaptativa (**Figura 1.7.**).

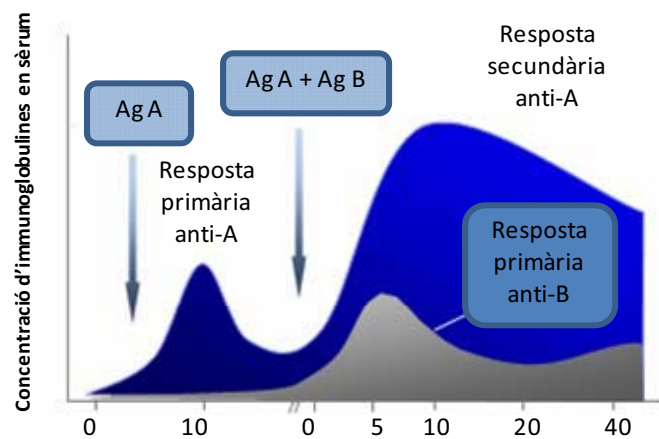


Figura 1.7. Esquema representatiu d'una resposta primària i secundària

Ambdues respostes són, qualitativament i quantitativament, diferents. Les diferències essencials són:

- En la resposta primària els nivells màxims d'immunoglobulines arriben després d'un període de latència després de l'estímul antigènic, mentre que en la resposta secundària aquests nivells màxims s'obtenen més ràpidament.
- La resposta primària és de menor intensitat que la secundària.
- En la resposta primària predomina la immunoglobulina M, mentre que en la secundària predomina la IgG.
- La resposta secundària és més permanent en la seva acció ja que les immunoglobulines IgG tenen una vida mitja més llarga.

Quan un antígen activa per primera vegada els limfòcits B, aquests necessiten temps per a diferenciar-se en les cèl·lules plasmàtiques responsables de la síntesi de immunoglobulines, mentre que quan es tracta de la resposta secundària, gràcies a la permanència de les cèl·lules de memòria, s'arriba molt abans al nivell necessari requerit de cèl·lules plasmàtiques. Aquests sistemes funcionen de manera seqüencial, enviant-se informació entre ells per a una eficaç eliminació del patògen. Així, un cop que entra el patògen superant les barreres fisiològiques inicialment es posa en funcionament el sistema immune innat, amb cèl·lules i factors solubles que intentaran d'eliminar-lo. Un cop activat aquest sistema, i només en el cas dels vertebrats, es pot posar en marxa el sistema immune específic adaptatiu, tot i que coordinat amb els components del sistema immune innat. Com a exemple d'aquesta cooperació trobem els macròfags, que actuen tant en l'eliminació dels patògens com en la presentació dels antígens mitjançant el CMH. També els anticossos IgM i IgG són

capaços d'activar els sistema del complement per la via clàssica, així com la citotoxicitat mostrada per part de les cèl·lules natural killer (NK) a través dels anticossos.

1.2.4. Concepte d'antigen i haptè

Es coneix com antigen tota substància amb capacitat per a generar una resposta immune, sent reconeguda com a estranya pel sistema immune. Sabem que pràcticament qualsevol tipus de molècula biològica, incloent-hi sucres, lípids, hormones, metabòlits intermitjos, fosfolípids, àcids nucleics i proteïnes poden ser antigens. Normalment el sistema immune no s'activa per antigens de baix pes molecular. Si es volgués activar el sistema immune i produir anticossos específics, aquests antigens haurien d'unir-se a una macromolècula. Els anticossos produïts davant un antigen s'uneixen específicament a epítops determinats d'aquests mitjançant ponts d'hidrogen i interaccions de Van der Waals. Aquesta capacitat d'unió antigen-anticòs (Ag-Ab) és la característica més important i comú de totes les immunoglobulines. Al ser una unió no-covalent, la reacció Ag-Ab és reversible, trobant-se els antigens i els anticossos en un equilibri dinàmic amb el seu complex. Aquest equilibri es regeix per l'equació de Michaelis-Menten, podent-se definir una constant d'associació Ag-Ab (K_M).

En general els antigens son més grans que la zona que participa en la unió de l'anticòs, de manera que un anticòs només s'uneix a una zona molt restringida de l'antigen anomenada epítop o determinant antigènic. Clàssicament s'anomenava antigen a tota molècula capaç de generar un anticòs. En l'actualitat en canvi, es considera antigen a qualsevol molècula capaç d'unir-se a un anticòs independentment que ho pugui generar per sí mateix, mentre que els antigens que són capaços de generar un anticòs se'ls anomena immunògens.

En aquest mateix sentit es defineix el concepte haptè com una molècula de baix pes molecular (menys de 5000 Da) que per si sola no indueix la formació d'anticossos però que al unir-se a una proteïna transportadora estimula una resposta immunogènica.

1.2.5. Immunoglobulines

Al final del segle XIX, Von Behring va observar que els sèrums d'animals que havien patit diftèria contenien substàncies que neutralitzaven els efectes de la toxina diftèrica A. Aquestes substàncies, que es caracteritzaven per ser termolàbils i no dialitzables, les va anomenar anticossos, degut a la seva capacitat de reconèixer les toxines bacterianes.

Al 1937, Tiselius va descobrir l'electroforesi i va aplicar aquest nou mètode al fraccionament de les proteïnes plasmàtiques, identificant així els anticossos com les proteïnes del sèrum que es desplacen més lentament. Aquesta fracció va rebre el nom de γ -globulina, associant temporalment els noms de γ -globulina i anticòs.

Posteriorment, es va comprovar que no tots els anticossos migraven electroforèticament amb les γ -globulines sinó que molts d'ells ho feien amb les α i β globulines. Això es va observar analitzant els nivells de les diferents fraccions de globulines abans i després de la immunització d'animals amb un antigen (**Figura 1.9.**).

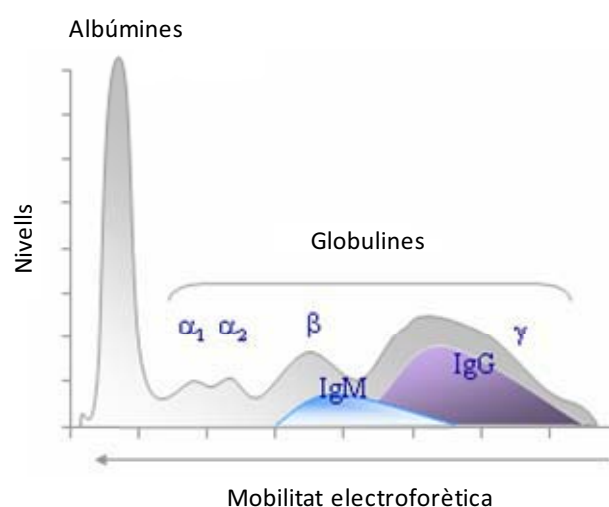


Figura 1.9. Proteïnes sèriques separades mitjançant electroforesi.

Es va concloure doncs, que no tots els anticossos són γ -globulines pel que Hebermans va proposar el terme immunoglobulina per designar a totes aquelles substàncies amb capacitat d'anticòs. Avui dia es coneixen 5 tipus d'immunoglobulines: IgM, IgA, IgG, IgD i IgE (**Taula 1.3.**).

Taula 1.3. Algunes característiques bioquímiques de les immunoglobulines.					
Classe	PM	Coef. sedimentació ^a	Velocitat de síntesi ^b	Vida mitja dies	Contingut de carbohidrats (%)
IgG	150 000	6.5	28	30	2.5
IgA	160 000	7.7	10	8	10
IgM	900 000	19	7	10	11
IgD	180 000	7	0.016	0.4	10
IgE	280 000	8	0.0005	-	10

^a (S), Unitats svedberg, ^b (mg/Kg/dia).

1.2.5.1. Estructura de les immunoglobulines

Les immunoglobulines són glicoproteïnes que, com ja va indicar Porter l'any 1959, estan formades per cadenes polipeptídiques que depenen del tipus d'immunoglobulina, es troben agrupades en una o varies unitats estructurals bàsiques. Cada unitat està composta per quatre cadenes polipeptídiques unides entre elles per ponts disulfur i altres unions de tipus no covalent. Dos de les cadenes són de baix pes molecular (aproximadament 22 KD) i dos d'elevat pes molecular (50-70 KD, depenent del tipus d'Ig) [50]. Els polipèptids de baix pes molecular reben el nom de cadenes lleugeres o cadenes L (Light) i les d'elevat pes molecular, cadenes pesades o cadenes H (Heavy).

a. Part variable i constant de les cadenes lleugeres i pesades

Estructuralment, les cadenes llargues posseeixen dos zones. La corresponent a l'extrem carboxílic diferencia les cadenes llargues en dos tipus k i l, i constitueix la part constant de les cadenes lleugeres (CL). L'altre zona correspon a l'extrem amino, i constitueix la part variable de les cadenes lleugeres (VL). És la zona corresponent a la interacció amb l'antigen [51].

També les cadenes pesades posseeixen una part variable i una altre constant. Aproximadament la tercera part de l'extrem amino d'aquestes cadenes es caracteritza per ser estructuralment molt variable, pel que es coneix com a part variable de les cadenes pesades (VH). L'estructura d'aquest fragment, de la mateixa manera que en les cadenes lleugeres, depèn del tipus d'antigen que reconeix, ja que aquest extrem també participa en la unió de les immunoglobulines amb l'antigen. Pel contrari, aproximadament les dos terceres parts de l'extrem carboxílic de totes les cadenes pesades d'un mateix tipus d'immunoglobulines posseeixen una estructura idèntica. D'aquí que aquesta part de les cadenes pesades es conegui com a part constant (CH).

Aquesta part constant és diferent en funció del tipus d'immunoglobulina que considerem, determinant l'existència de 5 tipus de cadenes pesades que defineixen el tipus d'immunoglobulina que és: IgM, IgA, IgG, IgD i IgE (**Figura 1.10**).

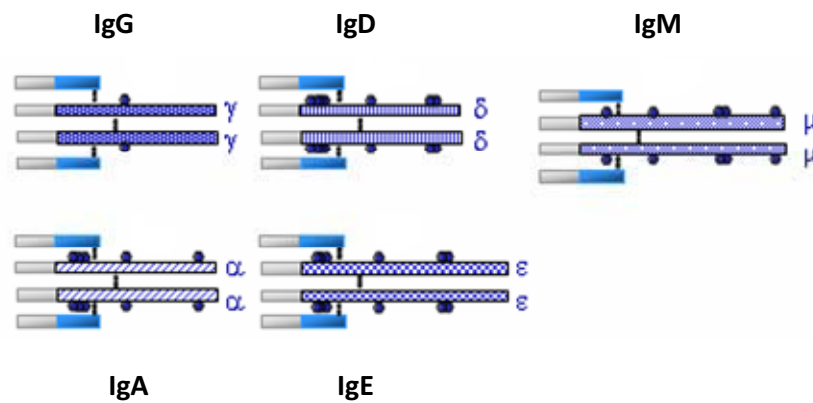


Figura 1.10. Estructures bàsiques de les immunoglobulines G, A, M, D i E amb els seus components hidrocarbonats (representats per petites boles).

b. Subclasses de les immunoglobulines

Es coneix que no totes les immunoglobulines de la mateixa classe tenen idèntica estructura, sinó que dins de cada classe es poden establir subclasses, considerant la seqüència d'aminoàcids de la regió constant de les cadenes H i el diferent nombre i situació dels ponts disulfur intercatenaris establerts entre les cadenes pesades [52]. Així, la IgG humana es divideix en 4 subclasses (IgG₁, IgG₂, IgG₃ i IgG₄) i la IgA i IgM en dos tipus (IgA₁ i IgA₂; IgM₁ i IgM₂) respectivament. Les regions constants de les cadenes pesades d'aquestes subclasses d'immunoglobulines es coneixen amb el nom de variants isotòpiques i son les mateixes en tots els individus d'una mateixa espècie.

c. Distribució de les immunoglobulines

Les immunoglobulines es troben distribuïdes en tots els fluids orgànics dels vertebrats i en les membranes dels limfòcits B i cèl·lules plasmàtiques. Les quantitats relatives de cadascuna de les classes d'immunoglobulines en els diferents compartiments de l'organisme son molt diferents.

Al torrent sanguini predomina la IgG mentre que en les secrecions (saliva, llàgrimes, secreció bronquial i mucoses) la IgA és la més important. Els valors normals en sèrum d'un home adult (entre 20 i 40 anys) es recullen a la **Taula 1.4**. De totes maneres els nivells d'immunoglobulines sèriques varien àmpliament en funció de diversos aspectes, tals com l'estat nutricional, l'edat, etc.

Taula 1.4. Concentració d'immunoglobulines en sèrum adult normal ($\mu\text{g}/\text{mL}$).			
Classe	Concentració	Nivell inferior	Nivell superior
IgG	1 2500	9500	1 5500
IgM	900	700	1100
IgA	2100	1600	2600
IgE	0.004	0.002	0.006
IgD	2	1	3

Es produeixen molts canvis en els nivells d'immunoglobulines des del naixement d'un individu fins els 8 o 10 anys, on aquests s'estabilitzen. En la **Figura 1.11.** s'observa una representació de les concentracions d'immunoglobulines des d'abans del naixement fins els 5 anys d'edat. Els nivells de IgG són molt elevats en la vida fetal i en les primeres setmanes de vida extrauterina, degut a que aquesta immunoglobulina és la única que passa de la mare al fetus a través de la placenta. Durant la lactància els nivells de IgG decreixen degut a que el nen no té encara la capacitat de síntesi d'aquestes.

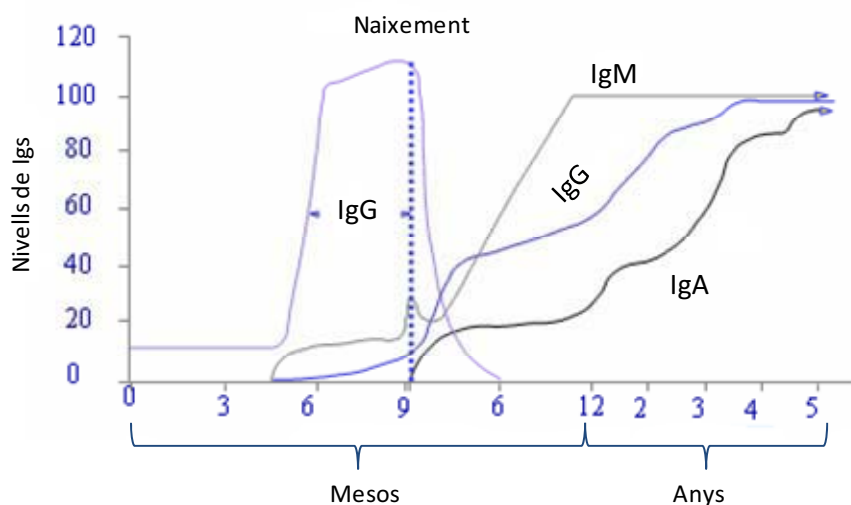


Figura 1.11. Nivells sèrics d'Ig, en percentatges, durant el desenvolupament fetal i primers anys de vida.

d. Propietats i funcions de cadascuna de les immunoglobulines

- **Immunoglobulina G**

Són les immunoglobulines més abundants i representen més del 70% de les Igs sèriques totals. Les diferents subclasses es presenten en proporcions molt diferents. La IgG₁ és

la subclasse més freqüent (més del 60%), seguida de la IgG₂ (aproximadament un 18%), mentre que IgG₃ i IgG₄ es troben en menor proporció. Aquesta immunoglobulina posseeix capacitat neutralitzant, precipitant, de fixació del sistema del complement, unió a les cèl·lules NK i a macròfags (opsonització), i poden travessar activament les membranes biològiques. Com el fetus només sintetitza petites quantitats d'aquestes immunoglobulines, adquireix aquests a través de la mare, no només a través del cordó umbilical, sinó també durant la lactància, període en el qual encara no ha desenvolupat la capacitat total de síntesi.

Les IgG tarden en aparèixer després d'un primer contacte o sensibilització amb l'antigen, però després d'un segon contacte, la majoria de les immunoglobulines formades pertanyen a la classe IgG (Resposta secundària).

Taula 1.5. Principals característiques de la resposta primària i secundària.		
Component	Resposta primària	Resposta secundària
Cèl·lula B	No preactivades (verges)	Memòria
Temps de resposta	Generalment 5-10 dies	Generalment d'1-5 dies
Durada de la resposta	Curta	Llarg període
Isòtop anticòs	Predominant IgM	Predominant IgG
Afinitat de l'anticòs	Baixa	Alta

- **Immunoglobulina M**

Els anticossos del tipus IgM són els que més ràpidament es formen davant d'un estímul antigènic (resposta primària). Aquesta immunoglobulina es caracteritza també per posseir capacitat neutralitzant, precipitant, aglutinant, fixar el sistema del complement, i activar la resposta immune, però en canvi no traspasa activament les membranes biològiques. Aquesta última propietat fa que aquesta immunoglobulina exerceixi la seva acció normalment en els espais intravasculants. Representa entre 5 i el 10% de les Igs sèriques totals i junt amb la IgD és la més freqüentment trobada en les superfícies dels limfòcits B com a immunoglobulina de membrana.

- **Immunoglobulina A**

Aquesta immunoglobulina posseeix capacitats neutralitzant i precipitant, mentre que la seva capacitat de fixar el complement i d'opsonització són molt dèbils, limitant-se el seu

efecte a neutròfils però no a macròfags. La propietat més important d'aquesta immunoglobulina ve determinada per la seva capacitat d'unir-se per l'extrem Fc a la peça secretora, glicoproteïna formada a les cèl·lules epitelials i glàndules exocrines que facilita la solució de les IgA a les mucoses i líquids biològics (especialment IgA₂). D'aquesta manera les IgAs són les responsables de protegir precisament els punts més vulnerables de l'organisme, com són els ulls, la boca, l'aparell digestiu, sistema respiratori, vagina, etc. Aquesta immunoglobulina es troba també en la llet materna.

- **Immunoglobulina D**

Les concentracions d'aquestes immunoglobulines en sèrum són molt baixes. Fins fa relativament poc no es va demostrar que aquesta immunoglobulina posseïa la capacitat d'unir-se a antígens, per la qual cosa es dubtava que actués com un anticòs. Tot i això, actualment però, no es coneix amb precisió quines són les seves funcions específiques, s'intueix que col·labora de forma important en l'activació de limfòcits B.

- **Immunoglobulina E**

Aquesta immunoglobulina és present en un gran nombre d'individus al·lèrgics. L'estímul per a la seva síntesi pot procedir d'una gran varietat d'antígens, els quals es coneixen com a al·lèrgens. Aquests al·lèrgens poden entrar a l'organisme a través de la pell o de les mucoses respiratòries, oculars, aparell digestiu, etc., així com per injectables, com es el cas de molts fàrmacs. La vida mitja d'una IgE en sang perifèrica és de 24-48 hores. No tenen capacitat de travessar la placenta, per tant, les reaccions d'hipersensibilitat immediata no poden transferir-se de manera passiva de la mare al fetus. En canvi, pot existir una predisposició de tipus familiar a patir malalties de tipus al·lèrgiques. Aquesta predisposició sembla estar relacionada amb una tendència a produir anticossos de tipus IgE en la resposta secundària davant d'antígens, en lloc de les IgG, resposta normal en individus no al·lèrgics.

La IgE es pot trobar en forma lliure en sang amb nivells que canvien al llarg de l'edat de l'individu (**Taula 1.6.**). Però la IgE també es troba en altres líquids biològics, així com unida a basòfils i mastòcits, gracies a la propietat que tenen aquestes immunoglobulines a unir-se pel seu extrem Fc a receptors de superfície presents en aquestes cèl·lules. Són aquestes cèl·lules les responsables d'alliberar els mediadors químics que produeixen la resposta al·lèrgica (histamina).

Taula 1.6. Valors normals de IgE totals en sèrum.

Edat	UI/mL (UI = 2.3 ng)
Fins 1 any	1-10
1 a 3 anys	10-20
4 a 6 anys	20-35
7 a 9 anys	35-50
A partir de 10 anys	5-100

1.3. Reaccions d'hipersensibilitat

1.3.1. Classificació de Gell-Coombs

La paraula al·lèrgia va ser utilitzada per primer cop per Von Pirquet per denotar tant la resposta immune protectora de l'hoste com la potencialment perjudicial [53]. D'una manera similar, la paraula "hipersensibilitat" va ser descrita per primera vegada per a denotar l'estat d'un mamífer després d'una exposició a un agent infeccios. El mamífer és "hipersensible" i per tant, capaç de recaure a una segona exposició de l'agent causant de la hipersensibilitat. Per tant, aquests dos termes han assolit la connotació de "resposta negativa a algun agent extern". En aquest context, Gell i Coombs van desenvolupar la seva acceptada classificació de reaccions d'hipersensibilitat [54]. Aquesta classificació ha desconcertat a innumerables generacions d'estudiants de medicina que han hagut d'encasellar diferents desordres immunològics dins d'aquesta classificació. Bona part de la confusió pot venir per part dels antígens.

Tot i les aparents confusions que la classificació de Gell i Coombs ha generat en els últims anys, aquesta és interessant per entendre el significat original de la paraula al·lèrgia. Els quatre tipus d'hipersensibilitats es poden entendre com quatre estratègies que el cos utilitza per combatre els agents infecciosos. A més dels quatre tipus d'hipersensibilitats descrites per Gell i Coombs es pot incorporar una cinquena que complementaria la classificació inicial.

1.3.1.1. Reacció d'hipersensibilitat de tipus I

Les hipersensibilitats de tipus I es coneixen també com a immediates. La reacció pot afectar la pell (urticària i èczemes), ulls (conjuntivitis), zona nasofaringia (rinorrea, rinitis), els teixits broncopulmonars (asma) i els que van fins el tracte gastrointestinal (gastroenteritis). La

reacció pot causar una gran varietat de símptomes que van des de molèsties menors fins a la mort. El temps de resposta generalment és de més de 15-30 minuts des del moment de l'exposició a l'antigen, tot i que a vegades pot tenir un inici retardat (10-12 hores).

El mecanisme de reacció consisteix en la producció d'immunoglobulines, preferentment d'IgEs en resposta a certs antigens (anomenats al·lèrgens). El mecanisme exacte pel qual alguns individus són més propensos a la hipersensibilitat de tipus I no està gens clar. En canvi, s'ha demostrat que aquestes persones preferentment produeixen més cèl·lules Th2, les quals secreten interleukines IL-4, IL-5 i IL-13, afavorint la creació d'immunoglobulines de tipus E. Com que la IgE té gran afinitat pel receptor (Fc ϵ , CD23) en els mastòcits i basòfils, normalment aquesta immunoglobulina es troba unida a aquesta cèl·lula. Una exposició posterior al mateix al·lèrgen pot provocar un alliberament de substàncies farmacològicament actives per part d'aquests mastòcits i basòfils (**Figura 1.12.**). La degranulació d'aquestes cèl·lules està precedida per un augment de l'afluència de Ca^{2+} , que és un procés crucial. Els ionòfors que augmenten el Ca^{2+} citoplasmàtic també promouen la degranulació, mentre que els agents que esgoten el Ca^{2+} citoplasmàtic suspenen la degranulació.

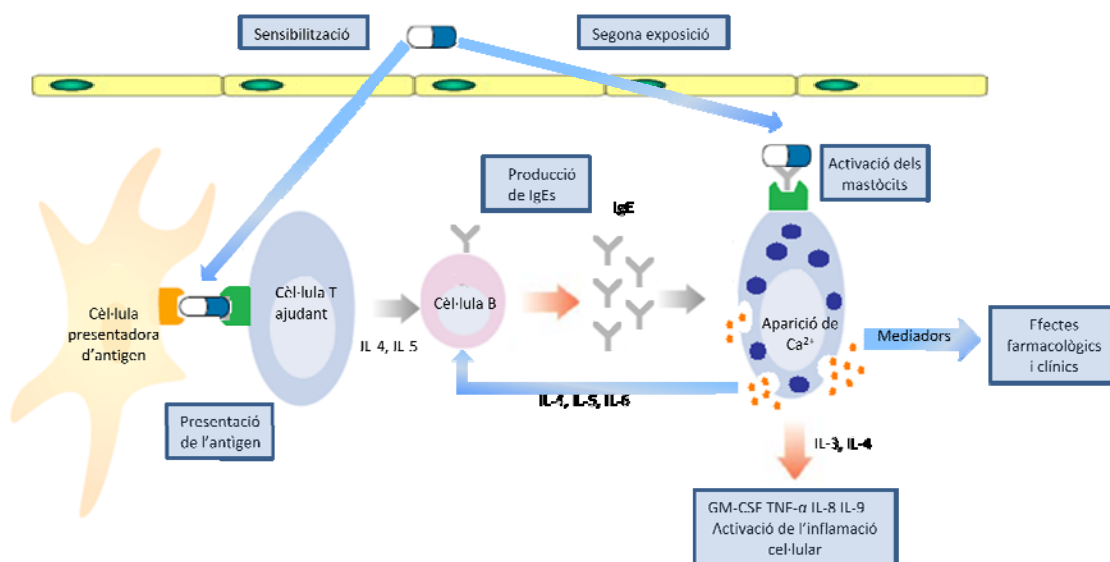


Figura 1.12. Inducció i els mecanismes efectors de la hipersensibilitat de tipus I.

Els agents alliberats pels mastòcits i els seus efectes es mostren a la **Taula 1.7**. Els mastòcits poden ser provocats per altres estímuls com l'exercici, l'estrès emocional, els productes químics o anafilotoxines. Aquestes reaccions, tot i no ser d'hipersensibilitat, produeixen els mateixos símptomes.

Taula 1.7. Mediadors farmacològics de la hipersensibilitat immediata.	
Mediadors preformats en els grànuls	Simptomatologia
Histamina	Broncoconstrucció, secreció de mocs, vasodilatació, permeabilitat vascular
Triptasa	Proteòlisi
Quininogenasa	Quinines i vasodilatació, permeabilitat vascular, edema
ECF-A (tetrapèptids)	Atracció d'eosinòfils i neutròfils
Mediadors acabats de formar	Simptomatologia
Leucotriè B ₄	Basòfil atraient
Leucotriens C ₄ , D ₄	Igual que l'histamina, però 100 vegades més potent
Prostaglandines D ₂	Edema i dolor
PAF	Alliberació de l'agregació plaquetària i l'heparina: microcoàguls

1.3.1.2. Reacció d'hipersensibilitat de tipus II

La hipersensibilitat de tipus II és coneguda també com a hipersensibilitat citotòxica, i pot afectar una gran varietat d'òrgans i teixits. Els antígens són normalment endògens, tot i que els productes químics exògens que poden adherir-se a les membranes cel·lulars de l'individu també poden conduir a aquesta hipersensibilitat. Alguns símptomes poden ser anèmia hemolítica, granulocitopènia i trombocitopènia. El temps de resposta va des de dues hores fins a un dia. La hipersensibilitat de tipus II està principalment mediada per anticossos IgM, IgG i el complement (**Figura 1.13.**). Els fagòcits i les cèl·lules K tenen un paper important.

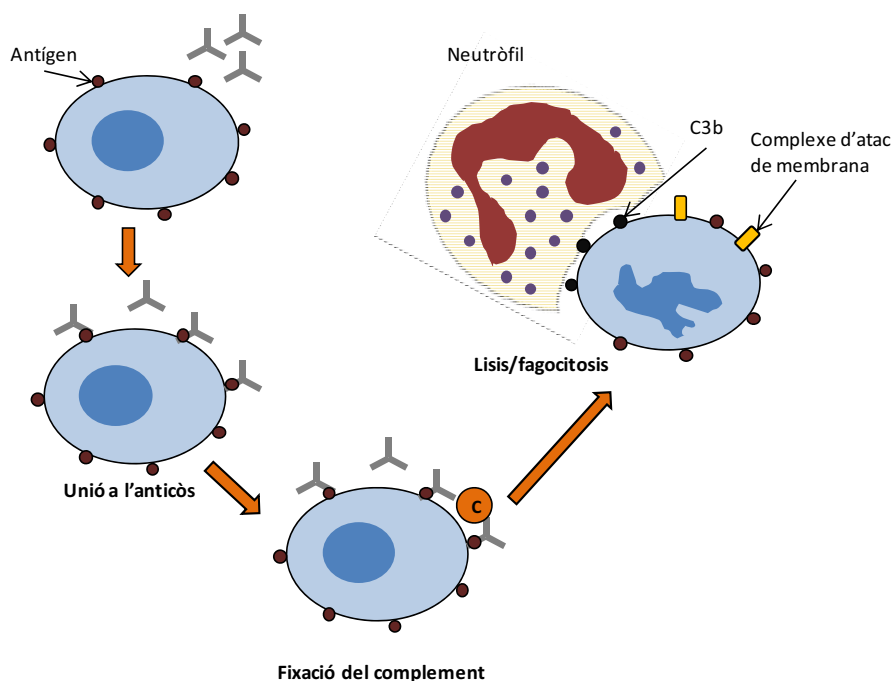


Figura 1.13. Mecanisme de citotoxicitat en la reacció d'hipersensibilitat de tipus II. Els anticossos de tipus IgG i IgM s'uneixen a aquests antígens cel·lulars de membrana, formant complexos que són capaços d'activar la via clàssica del complement, i la conseqüent eliminació d'aquestes cèl·lules. Es formen in situ mediadors inflamatoris aguts i el complex d'atac de membrana, complex de quatre proteïnes que formen part del complement i s'activen en les etapes finals del sistema immunitari provocant la lisi i mort cel·lular.

1.3.1.3. Reacció d'hipersensibilitat tipus III

La hipersensibilitat de tipus III també es coneix com a hipersensibilitat de complexos immunes. Aquest tipus de hipersensibilitat apareix quan hi ha un excés d'antígens en relació amb la quantitat d'anticossos presents, el que condueix a la formació de complexos moleculars Ab-Ag. A diferència de la hipersensibilitat de tipus II, els antígens solvatats no es troben units a la superfície cel·lular, i per tant dificulta la seva eliminació per part dels macròfags. Per tant, aquests complexos poden acabar precipitant en vasos sanguinis, articulacions, etc... Un cop els complexos s'han unit als llocs de deposició són capaços d'interactuar amb el complement, i per tant ser reconeguts com a patogènics, generant respostes inflamatòries o danys localitzats. Les causes d'aquests danys són el resultat de l'acció de les anafilotoxines produïdes pel clivatge dels components C3a i C3b del complement, els quals, respectivament, intervenen en l'alliberació d'histamina i en l'activació del sistema inflamatori.

La reacció pot ser de caràcter general o pot involucrar diversos òrgans incloent-hi la pell, ronyons, pulmons, vasos sanguinis, articulacions o altres òrgans. Aquesta reacció pot ser el mecanisme patogènic de les malalties causades per molts microorganismes. La reacció pot

aparèixer de 3 a 10 dies després de l'exposició a l'antigen. Està mediada per immunoglobulines de classe IgG, tot i que les IgM també poden estar involucrades. L'antigen pot ser exogen (infeccions bacterianes cròniques, virals o parasitàries) o endogen (lupus sistèmic). El dany final és causat per les plaquetes i els neutròfils (**Figura 1.14.**).

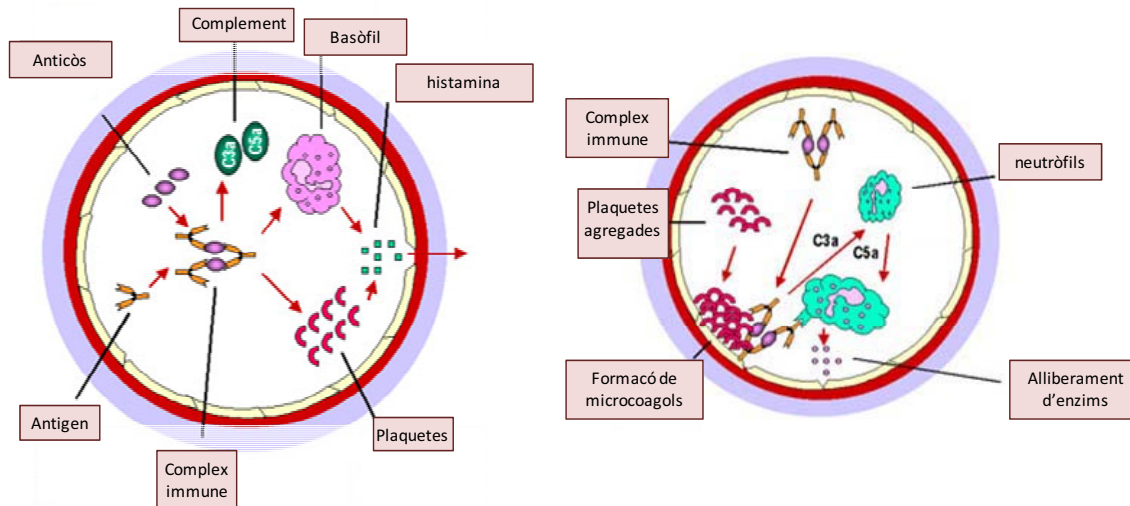


Figura 1.14. Mecanisme de danys en la hipersensibilitat de complexes immunes. La Figura representa la deposició de complexes immunes en les parets d'un vas sanguini.

1.3.1.4. Reacció d'hipersensibilitat de tipus IV

La hipersensibilitat de tipus IV també es coneix com la mediada per cèl·lules o hipersensibilitat de tipus retardat. Les cèl·lules T ajudants reconeixen els antígens presentadors sobre els complexos majors d'histocompatibilitat tant de tipus 1 com de tipus 2. Les cèl·lules presentadores d'antígens, els macròfags en aquest cas, secreten IL-12, la qual estimula la proliferació posterior d'altres cèl·lules T (CD4+). Aquestes cèl·lules CD4+ secreten IL2 i IF- γ conduint al posterior alliberament d'altres tipus de citosines de tipus 1, mitjançant d'aquesta manera la resposta immune. Les cèl·lules T citotòxiques (CD8+) activades destrueixen a les cèl·lules diana per contacte, mentre que els macròfags activats produeixen enzims hidrolítics i, en presència de certs patògens intracel·lulars, es transformen en cèl·lules gegants multinucleades. L'exemple clàssic d'aquesta hipersensibilitat és la reacció de la tuberculina, que arriba al seu màxim a les 48 hores després de la injecció de l'antigen. La lesió es caracteritza per la induració i l'eritema.

La hipersensibilitat de tipus IV està involucrada en la patogènesi de moltes malalties autoimmunes i infeccioses (tuberculosi, lepra, blastomicosi, histoplasmosi, toxoplasmosi,

leishmaniosi, etc). Un altre forma d'hipersensibilitat retardada és la dermatitis de contacte (productes químics, metalls pesats, etc.) en el que les lesions són més papulars. Les hipersensibilitats de tipus IV es poden classificar en 3 categories depenent de l'hora d'inici i la presentació clínica i histològica (**Taula 1.8.**).

Taula 1.8. Reaccions d'hipersensibilitat retardada.				
Tipus	Temps de reacció	Síntoma	Histologia	Antigen i lloc
Contacte	48-72 hores	Èczema	Limfòcits, seguit per macròfags, edema de la epidermis	Epidèrmic (metalls pesats, producte químic orgànic...)
Tuberculina	48-72 hores	Induració local	Limfòcits, monòcits i macròfags	Intradèrmic (tuberculina, lepromina...)
Granuloma	21-28 dies	enduriment	Macròfags, cèl·lules epitelials i gegants, fibrosis	Antigen persistent o la presència de cossos estranys (tuberculosi, lepra...)

1.4. Al·lèrgia a fàrmacs

La al·lèrgia a fàrmacs o RAFBI (reacció al·lèrgica a fàrmacs amb base immunològica) és un terme comunament utilitzat per representar un esdeveniment o efecte inesperat o no desitjat que succeeix quan un individu pren un fàrmac específic o agent terapèutic [55]. La ingesta d'aquest fàrmac pot ser voluntària o involuntària. Es coneix que aliments contaminants amb antibiòtics poden desencadenar una resposta al·lèrgica sense que l'individu sigui conscient de la causa. Les al·lèrgies a fàrmacs són un tipus de reacció adversa a fàrmacs i compren un gran ventall de reaccions d'hipersensibilitat amb mecanismes heterogenis i presentacions clíniques [56]. Les reaccions al·lèrgiques a fàrmacs poden afectar a un gran nombre d'òrgans i poden tenir més d'un únic camí mecanístic. Les manifestacions cutànies són les més comuns en els símptomes físics, però molts altres òrgans poden estar implicats, provocant anomalies hematològiques, hepatitis, pneumonitis, limfadenopatia o artràlgia. En general els fàrmacs β -lactàmics són els causants més comuns d'al·lèrgies farmacològiques, però també s'han descrit altres antibiòtics (sulfonamides, quinolones, tetraciclines, trimetoprim), NSAIDs (aspirina, ibuprofè, paracetamol, nolotil) i indicadors de contrast.

1.4.1. Sulfonamides

El descobriment de la sulfamidocrisoidin a l'any 1935 va esdevenir un gran avanç en la curació de diverses malalties infeccioses. Més tard, la sulfanilamida va ser identificada com el metabòlit actiu. En els següents 30 anys, molts derivats van ser sintetitzats per augmentar la família d'aquests antibiòtics [23]. Típicament, aquests antibiòtics es caracteritzen per un grup sulfonamida directament unit a una anilina en posició para (**Figura 1.15.**). Les sulfonamides han estat associades amb diverses reaccions al·lèrgiques de diferents graus. El mecanisme d'aquestes reaccions passa per la unió del grup nitrós provinent de l'anilina un cop oxidada amb els grups tiols de les proteïnes [26] (**Figura 1.15.**). A causa del risc de patir severes reaccions d'hipersensibilitat, moltes de les sulfonamides han estat retirades del mercat. Tot i això, alguns derivats com la sulfametoxazola, la sulfadoxina o el sulfisoxazole continuen en ús. Aproximadament entre el 2-5% de la població ha desenvolupat una reacció al·lèrgica contra algun o tots els fàrmac de la família de les sulfonamides.

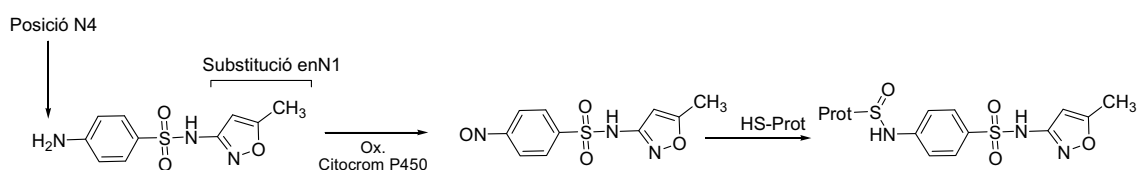


Figura 1.15. Sulfonamida prototip: el sulfametoxazole. Mecanisme d'haptenització.

Els símptomes més habituals inclouen febre, xoc anafilàctic, vasculitis sistemàtica, pneumonitis, hepatitis, miocarditis, nefritis intestinal, discràsia de la sang i diferents tipus de reaccions cutànies, incloses les reaccions de TEN o el síndrome de Stevens-Johnson.

1.4.2. NSAIDs

Moltes reaccions adverses de l'aspirina i altres fàrmacs antiinflamatoris no-esteroidals (NSAIDs) són no immunològiques. Tot i això, algunes reaccions anafilactoides d'aquests fàrmacs tenen característiques de reaccions mediades per IgE (succeeixen després de 2 o més exposicions, i són específiques). Tot i això, encara no s'ha pogut demostrar que existeixin IgEs específics contra aquests [57]. Només en el cas de la pirazolona (Nolotil) s'ha pogut demostrar que la hipersensibilitat té un marcat caràcter immunològic, tot i que hi ha pacients que

generen un asma crònic, inhibició de la prostaglandina i una sobreproducció dels cisteinil leucotriens, hi ha individus que produeixen IgEs específiques. Aquests poden presentar anafilaxi, febre, agranulocitosi, urticària i altres formes de erupcions cutànies. En cap cas s'ha pogut demostrar el mecanisme pel que es produeix l'al·lèrgia [58].

1.4.3. Altres fàrmacs que provoquen RAFBI

Les quinolones són una família d'antibiòtics sintètics que s'han estat utilitzant des del 1960. Des de fa molt de temps, aquests antibiòtics han estat utilitzats per tractar infeccions urinàries. Algunes reaccions adverses han aparegut de l'ús d'aquesta família d'antibiòtics, en la majoria de casos de tipus immunològic [59]. Les reaccions més freqüentment descrites són immediates, mediades per IgE. Les manifestacions clíniques més habituals inclouen pruritus, urticària, angioedema i xoc anafilàctic. Però, a més, les quinolones també han produït reaccions immunes retardades generant una gran varietat de símptomes, com la hepatitis, diferents formes d'exantema, nepritis, malalties del sèrum i discràsia de les cèl·lules sanguínies. En aquestes reaccions en rares ocasions s'ha demostrat que el mecanisme sigui immunològic.

L'eficàcia dels indicadors de contrast resideix en la concentració de iode que pot ser lliurat a un espai determinat dins del cos [55]. Les reaccions anafilactoides (anafilaxi no mesurada per IgEs) succeeixen al voltant del 1-3% amb pacients que reben indicadors de contrastos iònics i menys del 0.5% de pacients que reben agents no iònics [60]. El mecanisme exacte de perquè aquests indicadors de contrast poden generar aquest tipus de reaccions adverses és desconegut. Tot i això, s'ha comprovat l'alliberament d'histamina *in vitro*, el que fa pensar en una interacció directe entre el marcador i el receptor de membrana de les cèl·lules.

1.4.4. β -lactames

Les al·lèrgies a β -lactames són les més habituals, i concretament les penicil·lines són les que manifesten més reaccions adverses degut al gran ús a nivell mundial que se'n fa d'elles [61, 62]. Les reaccions més comuns són erupcions maculopapulars o morbiliformes i les urticàries. Tot i això, reaccions anafilàctiques severes succeeixen en algunes ocasions. Als anys 60 es va publicar un article sobre les anafilaxi produïdes per penicil·lines i es va observar que es produïa entre 1.5 i 4 casos de 10 000 [63]. Posteriorment, un estudi internacional va determinar la incidència de reaccions al·lèrgiques de pacients que s'havien d'injectar

mensualment penicil·lina G per prevenir la febre reumàtica. Aquest estudi va concloure que després de fer un seguiment a més de 2 700 pacients, el 2-3% d'ells varen patir una reacció al·lèrgica, d'on un 0.2% eren xocs anafilàctics [64]. Tot i que l'anafilaxi produïda per penicil·lines és poc habitual, aquest fàrmac continua sent el que causa més xocs anafilàctics avui dia als éssers humans [65].

Totes les penicil·lines contenen un anell β -lactàmic i un anell de tiazolidina. La variabilitat es troba en que la seva cadena lateral pot ser de naturalesa molt diversa (**Figura 1.16.**). Les penicil·lines, a causa de la poca estabilitat de l'anell β -lactàmic, poden unir-se a proteïnes endògenes a través de la formació d'enllaços amida entre els grups amino lliures de les lisines de les proteïnes i l'anell β -lactàmic [66]. Quan això succeeix s'obté el determinant antigènic peniciloil, conegut com el determinant antigènic majoritari. També s'ha descrit altres determinants, anomenats minoritaris, tot i que molts d'ells no s'han pogut aïllar ni caracteritzar (**Figura 1.17.**). Tots aquests determinants antigènics poden ser possibles inductors de reaccions al·lèrgiques contra β -lactames [67].

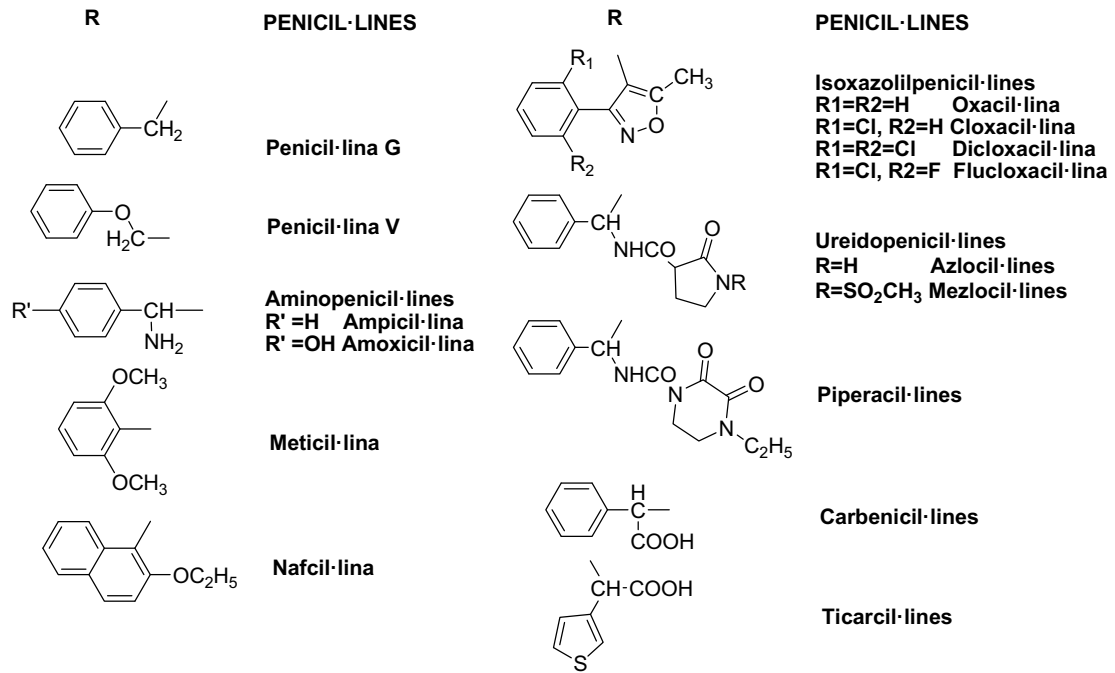
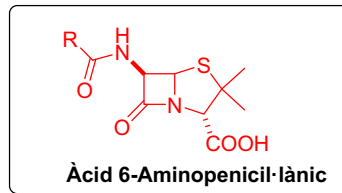


Figura 1.16. Diferències i similituds estructurals dels antibiòtics de la família de les penicil·lines.

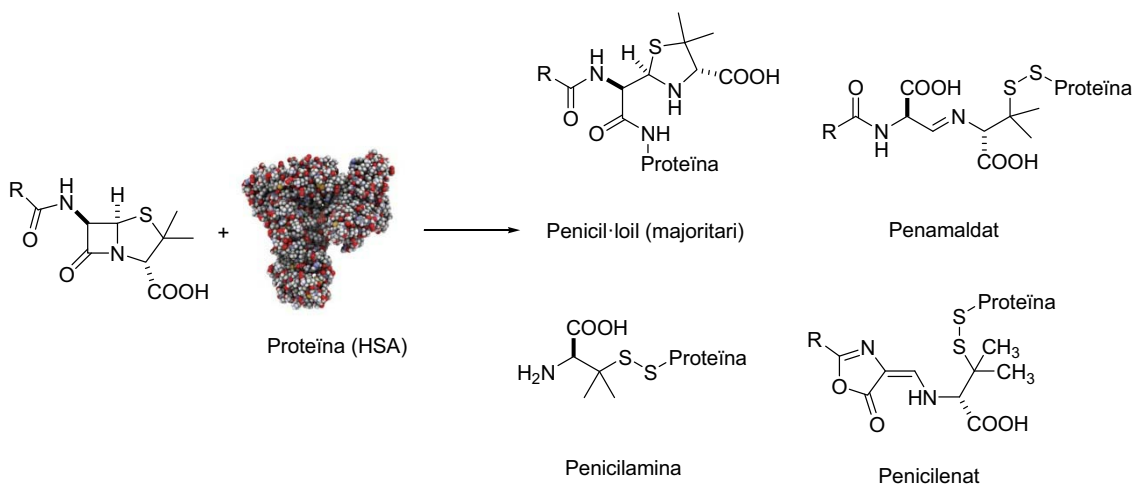


Figura 1.17. Determinat antigènic coneguts de les penicil·lines.

Depenent de l'estructura del determinant antigènic contra la qual s'han creat les immunoglobulines IgE, aquests anticossos detectaran específicament un sol fàrmac (ex. cadena lateral de l'amoxicil·lina), o detectaran tota la família d'aquests antibiòtics (ex. anell tiazolidínic).

En aquest context, la importància dels anticossos específics contra la cadena lateral ha estat demostrada en un estudi fet per Baldo i col·laboradors [68]. En aquest treball es va avaluar l'especificitat de les IgEs en pacients que havien patit reaccions contra la flucloxacil·lina. Estudis quantitius d'inhibició van demostrar que només la dicloxacil·lina, la cloxacil·lina i la oxacil·lina (penicil·lines que tenien un grup R similar a la flucloxacil·lina) eren reconegudes per les IgEs d'aquests pacients. En els últims 10 anys no s'ha millorat en el coneixement mecanístic en l'al·lèrgia a penicil·lines. És evident que el coneixement actual que hi ha de la problemàtica dista molt de ser extens. Tots els esforços i recursos per la detecció d'al·lèrgies a penicil·lines s'han enfocat en l'estudi dels determinants antigènics majoritaris, però ara per ara, l'única prova eficaç que hi ha per la detecció d'aquestes al·lèrgies és el test de provocació, consistent en la inoculació intravenosa a dosis creixents del fàrmac responsable de la reacció adversa.

El cas de les cefalosporines encara és més desconegut. El coneixement mecanístic dels determinants antigènics d'aquestes β -lactames és molt escàs, i només s'han fet estudis on s'observa un cert grau d'inhibició entre cefalosporines i penicil·lines (estudis de reactivitat creuada) [69]. L'estructura de les cefalosporines és semblant a la de les penicil·lines. L'anell central és una β -lactama amb un anell dihidrotiazínic (**Figura 1.18.**), mentre que algunes cefalosporines tenen les mateixes cadenes laterals que les principals penicil·lines. Tot fa pensar, doncs, que fàcilment un pacient al·lèrgic a penicil·lines o sigui també a cefalosporines i viceversa.

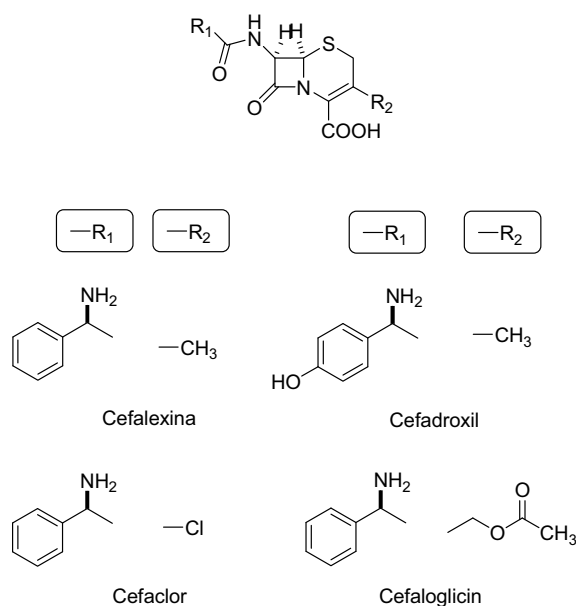


Figura 1.18. Diferències i similituds estructurals de les cefalosporines.

1.5. Mètodes de diagnòstic

El diagnòstic general per la detecció d'al·lèrgies comença amb l'historial clínic del pacient i una examinació física d'aquest [70, 71]. A continuació, una de les possibilitats per tal de confirmar l'al·lèrgia són els tests de sensibilització per diferents al·lèrgens tant en pell com en sang. Per tant, un pacient amb historial clínic positiu i un test de pell o sang positiu es considera que veritablement està patint una al·lèrgia. No obstant, hi ha pacients que tot i patir una reacció al·lèrgica donen una resposta negativa als tests (fals negatiu) mentre d'altres que no presenten símptomes d'al·lèrgia donen una resposta positiva als tests (fals positius).

Els tests de provocació *in vivo* s'utilitzen com a última opció. Aquests tests sotmeten al pacient a un gran perill ja que se li injecta el mateix al·lèrgen que ha desenvolupat la reacció al·lèrgica a dosis creixents.

1.5.1. Diagnòstic dels tests de pell

Els test de pell són un dels dos tests principals de confirmació d'al·lèrgies per presència d'IgEs específiques que s'utilitzen en el diagnòstic d'al·lèrgies actualment. Tant l'administració epicutània (conegut com test prick), com la injecció intradèrmica, introdueixen un extracte de l'al·lèrgen a la pell del pacient [72].

1.5.1.1. Test de pell epicutani

Portar a terme el test epicutani implica introduir una gota de l'al·lergen, normalment diluït en una solució salina de glicerinat, a la part superficial de la pell o epidermis (veure **Taula 1.9.**). A partir dels 15 o 20 minuts pot començar a apareixer una reacció immediata (pàpules i eritema). Finalment es mesuren els diàmetres de les pàpules obtingudes i es comparen amb el diàmetre d'una pàpula obtinguda amb histamina com a control. Els diferents al·lèrgens han d'estar suficientment separats per prevenir superposicions dels diferents eritemes. És normal trobar falsos positius com a resultat de sagnats o irritacions a la pell que eleven les concentracions d'histamina. Mentre que els falsos negatius poden aparèixer com a resultat de consumir antihistamínics o altres medicaments inhibidors de respostes inflamatòries. La variabilitat en el test de pell epicutani pot succeir com a resultat de diferents factors [73]. Com la resposta biològica del subjecte, l'habilitat del que fa la prova, la tècnica general utilitzada, els reactius, la concentració d'al·lergen i el mètode utilitzat per delimitar, mesurar i informar de la reacció.

Pel cas concret de les penicil·lines, a la **Taula 1.9.** es presenten tots els extractes al·lèrgènics que s'han utilitzat o s'estan emprant avui dia per fer els tests epidèrmics. Fa aproximadament uns 3 o 4 anys, van retirar del mercat tant els extractes BPO com MDM, ja que no seguien les normes de seguretat imposades per la Comissió Europea.

Taula 1.9. Concentracions recomanades per prick test [74].	
Al·lergen	Dosis
BPO ¹	5.10-5 mmol/l
MDM ²	2.10-2 mmol/l
Penicil·lina	20000-25000 U/ml
Amoxicil·lina	20-25 mg/ml
Ampicil·lina	20-25 mg/ml
Cefalosporina	1-2 mg/ml

¹BPO: Benzilpeniloil poli-L-lisina (Determinant majoritari) ²MDM: Minor Determinant Mixture (Benzilpenicil·lina sòdica, àcid benzilpenicil·loic, benzilpenicil·loic sòdic, etc.).

1.5.1.2. Test de pell intradèrmic

L'administració de l'al·lergen (entre 0.01 mL i 0.05 mL) es fa intradèrmicament utilitzant xeringues de tuberculina. Els resultats d'aquest test s'obtenen als 15 o 20 minuts, quan les pàpules i l'eritema es consideren màxims. Una injecció subcutània de l'al·lergen pot generar un fals positiu en el test, mentre que un petit canvi en el volum de l'extracte pot

alterar els diàmetres de les pàpules. La concentració de l'al·lergen i la presència d'histamina de manera natural pot modificar el resultat del test. Per obtenir la valoració final del test de pell s'ha de subministrar el mateix volum de la mescla però a diferents dilucions de l'extracte i en diferents parts de la pell. Mentre més sensibilitzat estigui el pacient a l'al·lergen, menys quantitat d'al·lergen caldrà per generar les pàpules del diàmetre establert. El test de pell intradèrmic requereix aproximadament concentracions 1 000 vegades inferiors d'antigen que el test de pell epicutani per produir la resposta adversa [75].

1.5.2. Test de provocació *in vivo*

Quan hi ha una discordança entre l'historial clínic i els resultats dels test de pell, s'ha de fer el test de provocació [72]. Alguns d'aquests tests poden ser la provocació bronquial o nasals, però normalment són per via intravenosa. En tots els casos es va subministrant el suposat al·lergen en dosis creixents (des de 0.05 mg/mL fins a 25 mg/mL). Els tests de provocació a fàrmacs (DPT) els han de fer personal mèdic, qualificat, i el pacient ha de ser hospitalitzat. El DPT només pot ser considerat després d'avaluar els riscos de cadascun dels pacients ja que els DPT poden causar reaccions molt severes o fatals [76]. Les desavantatges més importants, a part de la seva perillositat, és que el test no clarifica el mecanisme patogènic de la reacció i algunes vegades poden aparèixer falsos positius i negatius. No obstant això, a dia d'avui són les proves més fidels que hi ha pel diagnòstic d'al·lèrgies.

1.5.3. Test *in vitro* pel diagnòstic immunològic

La majoria de laboratoris clínics ofereixen tests serològics que poden ser útils en determinades circumstàncies pel diagnòstic de pacients amb hipersensibilitats de tipus I [77]. Aquests tests inclouen els assajos de proliferació limfocitars (LPA), els tests d'estimulació cel·lular (CAST), els tests d'activació de basòfils (BAT) i la mesura de les IgEs específiques en sèrum [78].

1.5.3.1. Assaig de proliferació limfocitari (LPA)

El LPA mesura en curt termini l'habilitat dels limfòcits per clonar-se en un medi de cultiu quan són estimulats per l'al·lergen. De manera natural, els limfòcits CD4+ proliferen quan hi ha una resposta a un al·lergen associat al complex major d'histocompatibilitat de

classe II en cèl·lules presentadores d'antigen. Així doncs, per tal que la proliferació dels limfòcits *in vitro* succeeixi, cal que el pacient hagi estat sensibilitzat anteriorment amb l'al·lergen [79].

Aquest test s'utilitza per diagnosticar reaccions d'hipersensibilitat retardades de tipus IV, ja que aquestes estan mediades pels limfòcits T. Els limfòcits s'aïllen i es cultiven en un incubador durant 5 dies. Una part de la sang es guarda intacta (no s'exposa a cap al·lergen) per tal de tenir un control negatiu. Una segona part s'exposa a un al·lergen universal per tenir el control positiu. Finalment, la tercera part de la sang s'exposa a l'al·lergen desitjat, a diferents concentracions, per assegurar que les condicions *in vitro* són el més similars possibles a les condicions *in vivo*. Aquests tests donen un gran nombre de falsos positius, sobretot quan es volen determinar al·lèrgies a metalls com l'or, pal·ladi o níquel [80, 81].

1.5.3.2. Test d'estimulació cel·lular amb l'al·lergen (CAST)

Aquest test *in vitro* consisteix en la determinació de sulfidoleucotriens (LTC₄, LTD₄, LTE₄) produïts per la interleukina IL-3 dels basòfils, els quals estan estimulats per la presència de l'al·lergen en qüestió [82-85].

La sensibilitat varia entre el 30-50% depenent del tipus de β -lactama utilitzada, mentre que tenen una especificitat del 80% o més. Per tant, tot i que no és el test ideal, un resultat positiu en el CAST contribueix a confirmar el diagnòstic d'al·lèrgia. S'han publicat alguns estudis on s'observen que aquests tests són positius pel cas de les reaccions de tipus I a les β -lactames [86].

1.5.3.3. Test d'activació dels basòfils (BAT)

La quantificació de l'activació de basòfils per citometria de flux ha demostrat ser útil per al diagnòstic de hipersensibilitats de tipus I en les al·lèrgies relacionades amb fàrmacs. La gran majoria dels estudis fets amb el BAT utilitzen els marcadors CD69 i CD203c per quantificar l'activació dels basòfils després d'una estimulació de l'al·lergen. Les cèl·lules perifèriques de la sang s'incuben amb l'al·lergen durant 15-40 min a 37 °C. Un cop aturada la reacció, s'utilitzen anticossos marcats que reconeixen els receptors cel·lulars dels basòfils [87]. El BAT és més sensible i específic que altres tests de diagnòstic *in vitro* en el camp de les al·lèrgies a fàrmacs. En el cas de les β -lactames, la sensibilitat del BAT es troba al voltant del 50% , mentre que la

seva especificitat és del 90%. En el cas dels NSAIDs, la sensibilitat varia entre el 66 i el 75%, i l'especificitat és al voltant del 93% [88].

1.5.3.4. Detecció de les IgEs específiques

La detecció de les IgEs específiques s'utilitza en casos de hipersensibilitat de tipus I. Normalment els immunoassaigs, són els mètodes in vitro més àmpliament utilitzats per a la detecció d'aquests anticossos, sent la seva determinació una pràctica habitual en al·lergologia, degut a diferents causes on les altres proves al·lergològiques no es poden aplicar.

- En grups de pacients on les proves cutànies són de difícil valoració (lactants, pacients amb dermatitis, dermatofimose o urticària)
- En pacients on les proves cutànies poden ser perilloses per la gran sensibilització que presenta (ex. Pacients amb sensibilització extrema a penicil·lines).
- Per donar suport al diagnòstic davant proves cutànies dubtoses o de difícil interpretació.
- Quan el pacient s'està tractant amb fàrmacs que poden influir en la reacció cutània i aquests no poden ser suprimitos.

a. RAST (radioal·lergosorbent test)

El Phadebas RAST (Phadia, Uppsala, Sweden) va ser el primer assaig desenvolupat i llançat al mercat per la detecció d'anticossos IgE específics a al·lèrgens [89]. Aquest mètode d'anàlisi es va convertir ràpidament en la tècnica més escollida degut a la seva sensibilitat i que permetia utilitzar extractes relativament impurs de mostra [90]. Mètodes més moderns es deriven d'aquesta tècnica. Són mètodes semiquantitatius en els que no es determinen directament quantitats reals de IgEs específiques sinó que s'utilitzen unitats arbitràries de RAST. Degut a la dificultat d'estandaritzar un sèrum de referència per cada al·lèrgen, s'utilitza una mescla de sèrums amb IgE específica pel pol·len del bedoll i la seva corba serveix de referència per a tots els al·lèrgens. La sensibilitat del RAST s'estima en uns 0.3 ng/mL d'IgE. El seu principal problema deriva de l'ús de material radioactiu.

b. EIA (Enzyme immunoassay)

Els assaigs no competitiu en fase sòlida són les tècniques més utilitzades actualment, durant aquests darrers anys s'han desenvolupat nombroses variants d'aquests tests [91]. A continuació s'expliquen alguns exemples:

- El ImmunoCAP de Phadia (UniCAP100, ImmunoCAP250) utilitza una fase sòlida que consisteix en discos de paper que s'activen amb bromur de cianogen. La unió de l'al·lergen a la cel·lulosa es fa covalentment, obtenint-se una preparació estable i reproduïble. Un cop la IgE del sèrum del pacient ha reconegut aquest al·lergen, aquesta unió es mesura mitjançant una anti-IgE marcada amb l'enzim β -galactosidasa, el qual catalitza una reacció colorimètrica fàcilment mesurable.
- El Immulite System de Siemens (Berlin, Alemanya) utilitza un al·lergen biotinitat que s'uneix a l'avidina de la fase sòlida. El format final d'assaig és molt semblant al cas anterior.
- El sistema HYTEC-288 de Hycor/Agilent Technologies (Santa Clara, Calif) utilitza un làmina de cel·lulosa on l'al·lergen està unit covalentment. També el format final és casi idèntic al de Phadia.

Els tres sistemes es realitzen en un autoanalitzador per maximitzar la precisió i minimitzar el temps. Tots ells utilitzen anti IgEs humanes unides a enzims o fluorescents, i es calibren interpolant el resultat en una corba de calibració d'IgEs totals a partir d'una mostra estàndard d'IgEs totals referenciada per la WHO (World Health Organization) [90].

1.5.3.5. Problemàtica derivada dels sistemes de detecció actuals per a IgE específiques a fàrmacs β -lactàmics.

En l'actualitat existeixen varies cases comercials que ofereixen diferents assaigs per a la detecció específica de IgE's contra determinants β -lactàmics. No obstant, els productes que ofereixen aquestes companyies són escassos i no engloben la totalitat dels determinants antigènics coneguts [92-95]. Per exemple, tant la casa comercial Siemens (3gAllergy Test)[96] com la casa Phadia (Immuno CAP test)[91] ofereixen tan sols assaigs específics per a 4 determinants antigènics majoritaris de Penicil·lina G, Penicil·lina V, Ampicil·lina i Amoxicil·lina. A més, la seva sensibilitat és inferior als test *in vivo*, amb el que el seu valor es únicament

complementari. La sensibilitat de les IgEs específiques per a aquests 4 antibiòtics no excedeix del 50%. La conclusió és que no existeixen determinants antigènics de IgE específiques per a tots els derivats β -lactàmics, i els que existeixen no són suficientment sensibles [56]. A això se li afegeix que els assaigs actuals tenen la limitació de ser individuals, cada assaig tan sols pot detectar IgE específiques per a un únic determinant antigènic.

1.6. Els antibiòtics: Implicacions generals

Els antibiòtics han estat utilitzats per curar una gran quantitat d'infeccions microbials des del descobriment de la penicil·lina per Alexander Fleming al 1928. El seu ús ha allargat la vida de moltes persones i animals durant tots aquests anys, però el sobreús dels antibiòtics també comporta efectes negatius. Per exemple, molts dels derivats làctics, com el iogurt o el formatge, no poden ser manufacturats si la llet original conté antibiòtics. Tot això ha generat que es creï una ampla legislació al voltant de l'ús d'antibiòtics en animals. En aquest treball ens hem centrat en les penicil·lines. A continuació, es discutirà l'ús d'aquests antibiòtics tant en humans com en animals de granja, i la seva repercussió en la producció d'aliments.

1.6.1. La utilització de fàrmacs antibacterians en humans

Els fàrmacs antibacterians són aquells que maten o inhibeixen el creixement de les bacteries. Originalment provenien d'altres microorganismes que els utilitzaven per protegir-se de les infeccions bacterianes. La penicil·lina G (benzilpenicil·lina) va ser l'antibiòtic original i a partir d'aquest molts altres van aparèixer tant naturals com sintètics (l'amoxicil·lina). Hi ha 4 tipus d'accions o mecanismes possibles per part dels antibacterians: la inhibició de la paret bacteriana, la inhibició de la síntesi de proteïnes en la paret bacteriana, la inhibició dels àcids nuclèics i la interacció en la producció d'àcid fòlic.

1.6.1.1. Inhibició de la paret bacteriana

La paret bacteriana es compon principalment de peptidoglicans. En les bacteries Gram negatives la paret cel·lular és molt més fina que en els Gram positius, els quals tenen un gruix de paret aproximadament de 40 capes de peptidoglicans. Cada capa es compon de N-acetilglucosamina i àcid *N*-acetilmuràmic alternativament, i les cadenes laterals dels pèptids s'entrecreuen per formar un enreixat. Si la paret bacteriana es fa malbé, les bacteries són

susceptibles a ser atacades per reactius químics i fins i tot poden perdre els components cel·lulars del seu interior [97].

Els inhibidors de la síntesis de la paret bacteriana més utilitzats són els antibiòtics β -lactàmics. Hi ha 4 tipus principals (les penicil·lines, les cefalosporines, els monobactams i els carbapenems) (**Figura 1.19.**). El mètode d'acció de les penicil·lines es discutirà més endavant. La penicil·lina G té una gran efectivitat contra les bactèries Gram positives, els cocs Gram negatius que no produeixen β -lactamases. Les penicil·lines antiestafilococals (com per exemple la nafcil·lina) són utilitzades contra els estafilococs i estreptococs, però són inactives contra els enterococs, bactèries anaeròbiques i cocs i bacils Gram negatius. Les penicil·lines semisintètiques (com l'amoxicil·lina) tenen una activitat molt ampla contra els bacils Gram negatius i els cocs Gram positius.

Les cefalosporines també contenen l'anell β -lactàmic però a més contenen un anell de dihidrotiazina. Són produïdes pel fong *Cephalosporium acremonium*. S'utilitzen quan les bactèries es fan resistents a la penicil·lina (per exemple, en tractaments contra la *Neisseria gonorrhoeae*) o si el pacient és al·lèrgic a la penicil·lina. Actuen de la mateixa manera que la penicil·lina però són més efectives contra les bactèries Gram negatives. Existeixen més de 70 cefalosporines diferents i normalment s'han d'injectar. Són més cares que les penicil·lines i tenen un espectre d'activitat més estret que les penicil·lines.

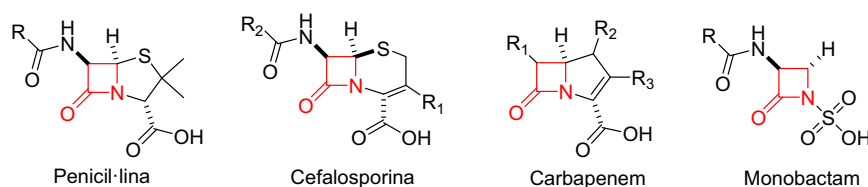


Figura 1.19. Antibiòtics β -lactàmics inhibidors de la paret cel·lular.

1.6.1.2. Inhibidors de la síntesi de proteïnes

Les proteïnes es sintetitzen als ribosomes. Els ribosomes de les bactèries tenen dos subunitats, la 50S i la 30S, mentre que els ribosomes humans tenen la 60S i la 40S. Per aquest motiu, els fàrmacs antibacterians poden interaccionar amb els ribosomes bacterials sense afectar l'hoste.

La inhibició de la síntesi de proteïnes pot afectar altres mecanismes. El cloramfenicol s'uneix a la subunitat 50S del ribosoma bacteriana i interferint en el complex acil-tRNA evitant la formació de l'enllaç peptídic. Es capaç d'inhibir un ampli marge de bactèries Gram positives i

Gram negatives així com algunes espècies de fongs, alguns exemples són la febre tifoide o algunes meningitis d'origen bacterià.

Les tetraciclines són similars però s'uneixen a la subunitat 30S del ribosoma. Eviten la unió de l'aminoacil-tRNA en el seu lloc acceptor, inhibint l'addició dels aminoàcids a la cadena polipeptídica. Hi ha un ampli ventall d'agents bacteriostàtics però necessiten un transport actiu per poder travessar la paret bacteriana. S'utilitzen per infeccions del tracte urinari, com la sífilis o la gonorrea i en el tractament de la pneumònia micoplasmàtica (**Figura 1.20.**).

Els macròlids (com l'eritromicina utilitzada en la legionel·la) s'uneix a la subunitat 50S, causant dissociacions entre el peptidil-tRNA i el ribosoma, interferint d'aquesta manera en l'elongació del pèptid.

Els aminoglicòsids (per exemple l'estreptomicina utilitzada en la tuberculosi) s'uneixen als ribosomes afectant la síntesi de proteïnes i les funcions de la membrana. El resultat és una mala interpretació del mRNA generant una proteïna anormal.

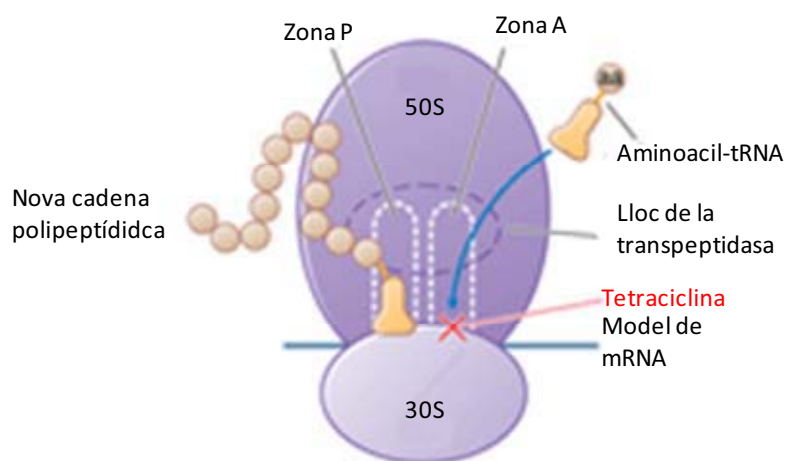


Figura 1.20. Mecanisme d'acció de les tetraciclines inhibint la síntesi proteica i evitant la unió de l'aminoacil-tRNA en el lloc acceptor.

1.6.1.3. Inhibidors dels àcids nucleics

Els inhibidors dels àcids nucleics suprimeixen la DNA girasa bacterià i la topoisomerasa II, fet que introdueix girs negatius en l'hèlix de DNA i fa que la doble hèlix es separi. Les fluoroquinolones (ex. ciprofloxacina) interfereixen en la replicació, transcripció i altres activitats del DNA. S'utilitzen contra bacteries Gram negatives, són efectives contra infeccions del tracte urinari i han estat utilitzades en infeccions de teixits tous, ossos, articulacions i en infeccions del tracte respiratori (**Figura 1.21.**).

Altres inhibidors d'àcids nucleics inclouen els que alteren les propietats de les parelles de bases del DNA. Doblen la distància entre parelles de bases adjacents generant mutacions. Els intercaladors de DNA, com la proflavina o la acriflavina s'utilitzen com a antisèptics tòpics.

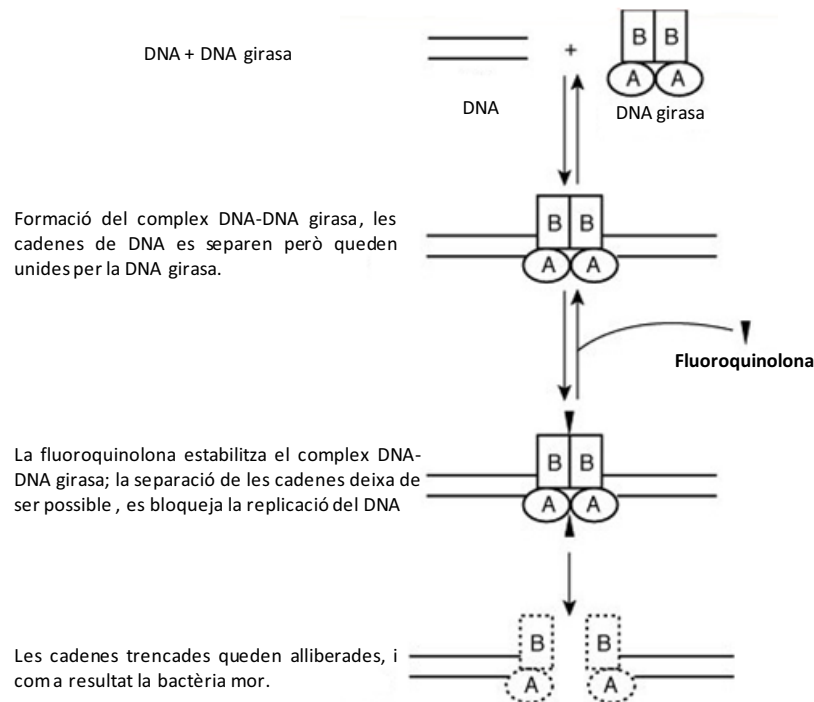


Figura 1.21. Mecanisme d'acció de les fluoroquinolones inhibint la producció de DNA bacterià.

1.6.1.4. Inhibidors de la producció d'àcid fòlic

Les bactèries sintetitzen els seu propi àcid fòlic ja que el necessiten per la producció de purines, una de les bases nitrogenades necessàries per la generació dels àcids nucleics. Les sulfonamides són factors del creixement anàlegs a l'àcid *p*-aminobenzoic (PABA), el qual es necessita per a que la bactèria produeixi àcid fòlic. Per tant, aquests antibiòtics actuen com a inhibidors competitiu (**Figura 1.22.**). El mecanisme d'acció consisteix en la unió de l'antibiòtic amb l'enzim dihidropteroat sintetasa, impedit així la síntesi d'àcid fòlic.

Les sulfonamides s'utilitzen per trahoma i infeccions del tracte urinari. La resistència a sulfonamides pot succeir com a resultat de mutacions en la producció del PABA, per baixa afinitat entre aquestes i l'enzim dihidropteroat sintetasa o per pèrdua de permeabilitat per part de la sulfonamida.

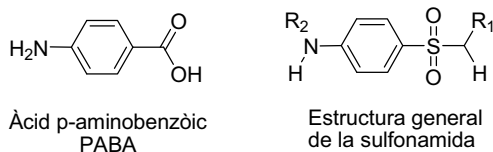


Figura 1.22. Similitud estructural entre el PABA i la sulfonamida.

1.6.2. L'ús de penicil·lines en medicina veterinària

Els antibiòtics han estat utilitzats en veterinària poc després del seu ús en medicina humana. El primer cop que es van utilitzar va ser pel tractament de mastitis en vaques afectades, pràctica que encara avui dia es continua fent [98, 99], junt amb tractaments per infeccions de pulmons i pell, i els abscessos en determinats òrgans.

La mastitis és una inflamació dels teixits mamaris normalment causat per una infecció bacteriana o per un canvi hormonal. Normalment succeeix durant la lactància materna. En vaques, el patogen entra en les glàndules mamàries a través de la punta del mugró. La llet esdevé anormal, escamosa, aiguada, coagulada i amb una pèrdua de color. S'estima que aquesta malaltia costa a les indústries productores de llet dels Estats Units uns 1.7-2 bilions de US dòlars cada any [100].

Els animals que estan tractats de mastitis necessiten temps per eliminar del seu sistema tot l'antibiòtic que han pres. S'estima que calen aproximadament uns 5 dies després del tractament. Quan aquestes directrius no es segueixen, la llet produïda pot contenir antibiòtics que són perjudicials per a la nostra salut i per a la producció de molts derivats làctics.

1.6.3. Presència de penicil·lines en els aliments

Totes les rutes esmentades d'administració d'antibiòtics poden donar lloc a l'aparició de penicil·lines en els aliments com ara carn, ous i llet. Per tal de protegir la salut pública, les substàncies farmacològiques actives han estat classificades en 4 Annexos de la Regulació del Concili (EEC), No 2377/90 del 26 de Juny 1990, la qual estableix un procediment comunitari on s'indica el límit màxim de residus permesos (MRL) de fàrmacs en productes de consum humà procedents d'animals. L'aparició d'aquests residus superior als permesos pot ser degut al incompliment dels temps d'espera després del subministrament [99] o la gran majoria de vegades a una incorrecta utilització dels productes amb o sense llicència per tractaments profilàctics. Els residus també poden trobar-se en els vedells alimentats amb llet de les vaques

que van rebre antibiòtics. Són molts i variats els que estudis mostren l'acumulació d'antibiòtics en llet animal [101, 102].

La gestió de les granges és molt important per ajudar a minimitzar l'ús d'antimicrobians. Tot i això, amb l'augment en la densitat de bestiar es necessita un millor control de les malalties i això implica l'ús intensiu d'antibiòtics, sovint com a mesura profilàctica, pràctica il·legal en la comunitat europea. Cal esmentar que, en el cas concret del subministrament de penicil·lines, per tal d'encobrir aquest fet en molts casos s'adultera la llet amb penicil·linases. Aquests enzims hidrolitzen les penicil·lines en solució, evitant la seva detecció en futurs controls de presència de fàrmacs [103-105].

1.6.4. Conseqüències en la producció d'aliments

En algunes àrees de la producció d'aliments la presència de penicil·lina és beneficiosa. El fong *Penicillium* es troba en el formatge blau (ex. *Penicillium camemberti* i *Penicillium roqueforti*). El *Penicillium nalgiovense* s'utilitza per millorar el sabor de les salsitxes i pernils i per evitar la colonització d'altres fongs i bacteris.

Tot i això, l'aparició de penicil·lina en llets afecta negativament a la producció de iogurts i formatges. Un estudi fet al 1949 va concloure que: "La qualitat del formatge produït es veu influenciada per la taxa i l'extensió de la producció d'àcid provinent dels bacteris presents per a la fermentació en les primeres etapes de fabricació. L'experiència en el camp indica que si un gran nombre de vaques han estat tractades de forma simultània contra mastitis, pot ser suficient la penicil·lina en llet de formatgeria per afectar de manera negativa a la fabricació dels productes làctics derivats [106]".

Es coneix que les penicil·lines afecten la producció de l'àcid làctic de les bacteris, un requeriment indispensable per a la fermentació de la llet que donarà pas a la producció de formatge i iogurt [107]. D'acord amb l'Agència Europea de Medicina, concentracions de 6 µg/kg de penicil·lina en llet inhibeixen substancialment els cultius inicials de producció de formatge retardant la producció d'àcid làctic[108]. Així doncs, la concentració màxima acceptable de penicil·lina en llet per a produir aquest tipus de productes no pot ser mai superior a 3 µg/kg.

Anifantakis descriu la velocitat d'expulsió de la penicil·lina G quan se li subministra a una cabra injeccions intramusculars o infusions intramamàries. Quan es subministra intramuscularment, la Penicil·lina G s'excreta en 24 hores i mitjançant infusions intramamàries

72 hores. Així doncs, la producció de iogurts no es podrà fer amb la llet extreta fins com a mínim 72 hores després de l'últim tractament mamari [109].

A part d'aquests problemes derivats de la presència de penicil·lines en llet per a la producció de derivats làctics, també poden aparèixer altres conseqüències com són l'aparició de reaccions adverses pel consum d'aquests productes. Tot i que les penicil·lines es consideren antibiòtics de baixa toxicitat amb pocs efectes secundaris, hi ha el risc de desenvolupar reaccions d'hipersensibilitat. Aquests tipus de reaccions immunològiques poden succeir en persones que prèviament han estat exposades a penicil·lines i han produït IgEs específiques. Quan aquestes persones es reexposen al fàrmac poden patir en poc temps una recaiguda, amb símptomes molt diversos com urticària, erupcions a la pell, dificultat per a respirar o, en casos mes greus xocs anafilàctics [110].

1.6.5. Conseqüències en el medi ambient per l'ús de penicil·lines

Degut a l'elevada producció de β -lactames a nivell mundial, s'estima que engloben el 65% de la producció mundial d'antibiòtics, on bona part d'aquests fàrmacs acaben arribant al medi ambient. D'altra banda, les penicil·lines administrades als animals també poden arribar al medi ambient a través dels fems o l'orina. La Directiva de la Xarxa de l'Aigua (2000/60/EEC)[111] de la Unió Europea no inclou les penicil·lines en la seva llista de substàncies que han de ser detectades, però no hi ha dubte que la seva presència existeix. Nombrosos estudis s'han dut a terme per tal de comprovar quina repercussió pot tenir la presència de β -lactames al medi ambient. Per exemple, es va observar que només calia una concentració de 6 $\mu\text{g/mL}$ de Penicil·lina G per inhibir el creixement de dues espècies de microalgues[112], o una concentració de 84.6 mg/L de Penicil·lina G per inhibir el creixement aeròbic i la nitrificació de les bactèries en els fangs de les depuradores [113].

Si bé és difícil controlar totes les substàncies químiques que apareixen a l'aigua, cal assenyalar que els agents antimicrobians són contaminants freqüents en les aigües superficials, i per tant afavoreixen el problema de la resistència bacteriana [114, 115]. La resistència bacteriana es tractarà més endavant en relació amb les penicil·lines (**apartat 1.6.7.3.**). L'ús indiscriminat dels agents antibacterians ha fet que moltes bactèries modifiquin part de la seva fisiologia per evitar la mort en presència d'aquests agents i això ha provocat que molts agents antimicrobians siguin tractats com possibles contaminants [116, 117].

1.6.6. Legislació referent a les penicil·lines

L'Agència de Medicina Europea (EMA), anteriorment coneguda com l'Agència Europea per a l'Avaluació dels Productes Mèdics (EMA), és l'organització europea per a l'avaluació dels productes mèdics, tant humans com veterinaris. Aquesta organització ha establert diverses Regulacions 2377/90/EEC on suggereixen quins són els nivells màxims permesos en aliments per aquests antibiòtics. Per tant, qualsevol mètode analític incloent els immunoassaigs han de ser capaços de detectar com a mínim aquestes quantitats.

1.6.6.1. Regulació 2377/90/EEC [118]

D'acord amb la Unió Europea, s'entén com residus de productes veterinaris totes les substàncies farmacològicament actives ja siguin els principis actius, els excipients, els productes de degradació o els metabòlits que romanen en els aliments obtinguts a partir d'animals. Es defineix per tant els MRLs com la concentració màxima de residu, provinent de medicaments veterinaris utilitzats, que han estat acceptats per la Comunitat Europea com a permesos legalment. El límit del MRL s'estableix per evitar que hi hagi efectes tòxics en la salut humana i es mesura en la ingesta diària admissible (IDA). Per tant, aquesta regulació mostra els MRLs permesos per les diferents penicil·lines utilitzades en medicina veterinària (vegeu la **Taula 1.8.**).

Taula 1.10. Límit màxim de residus (MRL) permesos en aliments d'origen animal (Regulació Europea EE C 2377/90).

Substàncies farmacològicament actives	Espècies animals	MRLs	Altres disposicions
Amoxicil·lina	Tot tipus d'aliments	50µg/kg ^a 4µg/kg ^b	Els MRLs no s'apliquen als peixos. Per porcí i aus de corral, el MRL de greix es refereix a "pell i greix en els productes naturals". No s'ha d'aplicar en animals que produeixen ous per a consum humà.
Ampicil·lina	Tot tipus d'aliments	50µg/kg ^a 4µg/kg ^b	Com per a l'amoxicil·lina.
Benzilpenicil·lina	Tot tipus d'aliments	50µg/kg ^a 4µg/kg ^b	Com per a l'amoxicil·lina.
Cloxacil·lina	Tot tipus d'aliments	300µg/kg ^a 30µg/kg ^b	Com per a l'amoxicil·lina.
Dicloxacil·lina	Tot tipus d'aliments	300µg/kg ^a 30µg/kg ^b	Com per a l'amoxicil·lina.
Nafcil·lina	Tots els remogant	300µg/kg ^a 30µg/kg ^b	Per a ús intramamaris solament.
Oxacil·lina	Tot tipus d'aliments	300µg/kg ^a 30µg/kg ^b	Com per a l'amoxicil·lina.
Fenoximetilpenicil·lina	Porcí Aus de corral	25µg/kg ^c 25µg/kg ^d	No s'ha d'aplicar en animals que produeixen ous per a consum humà.
Penetamat	Boví Porcí	50µg/kg ^a 4µg/kg ^b 50µg/kg ^a	Per porcí, el MRL de greix es refereix a "pell i greix en els productes naturals".

Teixit objectiu:^a Correspon a múscul, greix, fetge i ronyó, ^b Correspon a llet, ^c Correspon a múscul, greix i fetge, ^d Correspon a múscul, pell i greix, fetge i ronyó.

1.6.6.2. Directives i comissions de decisió referents a penicil·lines

Hi ha diverses directives vigents per a la regulació d'aquesta antibiòtics. Una d'elles és la Directiva 96/23/CE [119] del Consell, la qual estableix les directrius sobre les mesures respecte determinades substàncies i els seus residus en animals vius i productes animals. Cada membre del estat designa com a mínim un laboratori nacional de referència. Quan els residus excedeixen als nivells establerts o es detecten substàncies il·legals, s'han de portar a terme accions legals per assegurar la seguretat i salut pública. Hi ha dos grups de substàncies- A i B. Les penicil·lines estan dintre del grup B i tots els aliments provinents d'animals estan dintre d'aquest grup, la vigilància té com a objectiu controlar el compliment dels MRLs per als residus establerts en l'Annex I de la Regulació 2377/90/EC (**Taula 1.10.**)

Els laboratoris de referència de la comunitat van estar establerts per detectar els residus en animals vius (en els seus excrements, en els seus fluids i en els seus teixits), en

productes d'animals, en els aliments dels animals i en l'aigua potable. L'objectiu és ajudar als laboratoris nacionals de referència proveint tota la informació necessària per assegurar el correcte anàlisi de les mostres (per exemple, advertències tècniques, mètodes de validació...).

D'altra banda, la comissió de decisió 97/47/EC [120] inclou els mètodes per tractar mostres de llet, ous, carn de conill i mel els quals no estaven inclosos en la Regulació 96/23/EC. El nombre mitjà de mostres és d'1 per 15 000 tones de la producció anual de llet, amb un mínim de 300 mostres, aquesta és una quantitat considerable de mostres, la qual cosa augmenta la necessitat de buscar una forma més ràpida i rendible d'obtenir la mostra per la seva detecció.

Les següents directrius són les que s'han d'aplicar per a mostres de llet de vaca:

- a. El 70% de la mostra ha d'estar examinada per la detecció de residus de medicaments veterinaris. Per tant, cada mostra ha de ser examinada per a la detecció de com a mínim 4 compostos diferents de 3 grups diferents, per exemple, grup A6, B1, B2 de l'annex I de la Directiva 96/23/CE.
- b. El 15 % de les mostres han de ser examinades per la presència de residus en el grup B3 de l'Annex I de la Directiva 96/23/EC.
- c. Un 15 % ha de ser assignat d'acord amb la situació de l'Estat en qüestió.

La llet d'altres espècies s'avalua d'acord al nivell de producció i els membres associats pels membres de l'Estat i ha d'estar inclòs al pla nacional.

I una tercera directiva, la comissió de decisió 2002/657/EC [121], estableix que només les tècniques d'anàlisi, les quals poden demostrar d'una manera documentada que estan validades i tenen un taxa de fals compliment $< 5\%$ (β -error) al nivell d'interès, podran ser utilitzades per a la detecció amb fins de conformitat amb la Directiva 96/23/CE. En el cas d'obtenir un presumpte resultat fora del compliment, aquest resultat haurà de ser confirmat per un mètode de confirmació.

Els mètodes analítics acceptats per la EU es basen en tècniques de cromatografia/espectrometria. Tot i això, la UE ha establert que els laboratoris reglamentaris han de trobar les millors tècniques analítiques per a la detecció de substàncies farmacològiques i per tant, és possible que els mètodes d'ELISA tinguin un lloc en el futur si la seva eficàcia s'acaba demostrant.

1.6.7. Penicil·lines

1.6.7.1. Estructura i classificació

Les penicil·lines es componen d'un anell β -lactàmic unit a un anell de tiazolidina, generant l'estructura de l'àcid 6-aminopenicil·lànic (6-APA) (**Figura 1.16.**). Les penicil·lines poden estar classificades en 4 grups principals, basats en la seva habilitat per matar diferents tipus de bacteries.

a. Les penicil·lines naturals

Les penicil·lines naturals van ser les primeres en ser utilitzades amb fins terapèutics. La Penicil·lina G (PenG) és el fàrmac original, i a partir d'ella es van obtenir sintèticament les fenoximetilpenicil·lines (Penicil·lina V, feneticil·lina i propicil·lina). La diferència amb la Penicil·lina G és que tenen millor absorció i augmenten la resistència a la hidròlisi àcida de l'estómac.

b. Penicil·lines resistents a la penicil·linasa

La penicil·linasa és un enzim produït per certes bacteries que inactiven l'activitat de les penicil·lines. Els fàrmacs d'aquest grup són estructuralment resistent a les β -lactamases, tot i que tenen un ventall més estret d'activitat que les penicil·lines naturals.

La meticil·lina va ser el primer membre d'aquest grup, seguit de l'oxacil·lina, la nafcil·lina, la cloxacil·lina i la dicloxacil·lin [122].

c. Aminopenicil·lines

L'addició d'un grup amino a l'estructura original de la penicil·lina dona lloc a les aminopenicil·lines. El seu descobriment va ser de gran importància, ja que van ser les primeres en donar activitat contra les espècies Gram negatius (*E. coli* o *H. influenza*), a més de ser resistents als àcids, la qual cosa feia que es poguessin administrar oralment. L'ampicil·lina és una D- α -aminobenzil penicil·lina que ha estat utilitzada des dels anys 60. El derivat p-hidroxi de l'ampicil·lina, l'amoxicil·lina, té la mateixa activitat *in vitro* però mostra una millor absorció [123]. L'amoxicil·lina és la penicil·lina més utilitzada avui dia.

d. Penicil·lines d'ampli espectre

Les penicil·lines d'ampli espectre, que són a vegades anomenades penicil·lines antipseudomonals, inclouen les carboxipenicil·lines i les ureidopenicil·lines. Les carboxipenicil·lines es componen de l'esquelet β -lactàmic de totes les penicil·lines però a més incorporen un àcid carboxílic o un grup ester en la cadena lateral. Les ureidoampicil·lines són derivats de l'ampicil·lina on la cadena del grup amino ha estat derivatitzada amb diferents urees. Aquests fàrmacs tenen una activitat similar a les aminopenicil·lines però un espectre més ampli [122]. Són més susceptibles a les β -lactamses però tenen millor afinitat per les PBPs (proteïnes d'unió a penicil·lines). S'ha suggerit que l'habilitat de les ureidopenicil·lines per penetrar la membrana exterior dels organismes és el millor factor de l'activitat d'aquesta subclasse antibiòtics [124].

1.6.7.2. Mecanisme d'acció de les penicil·lines

En les bactèries Gram positives, la capa de peptidoglicà és molt important per la integritat de la paret cel·lular. En la síntesi d'aquest peptidoglicà, l'últim pas de transpeptidació és fa mitjançant una transpeptidasa coneguda com la proteïna d'unió a penicil·lines (PBP). Les penicil·lines són anàlogues a la D-alanil-D-alanina, la qual cosa fa que aquesta similitud estructural faciliti la seva unió als centres actius de la PBP. Les β -lactames s'uneixen irreversiblement amb el centre actiu, impeding l'etapa final de la síntesi de la capa de peptidoglicà i interrompent així la síntesi de la paret cel·lular (**Figura 1.23.**). Les bactèries Gram positives tenen una estructura simple en la que és possible que molècules polars, com les β -lactames, passin a través de la paret. En canvi, en les bactèries Gram negatives i les micobactèries les penicil·lines només poden accedir-hi a través de porus o canals.

Per a que la penicil·lina pugi exercir com a agent antibacterià, és necessari que la bactèria estigui en creixement o en divisió. En aquestes condicions, la pèrdua de transpeptidació i l'activitat normal de la paret fa que les hidrolases facin la paret cel·lular més feble i la bactèria és destruïda per lisi osmòtica [125].

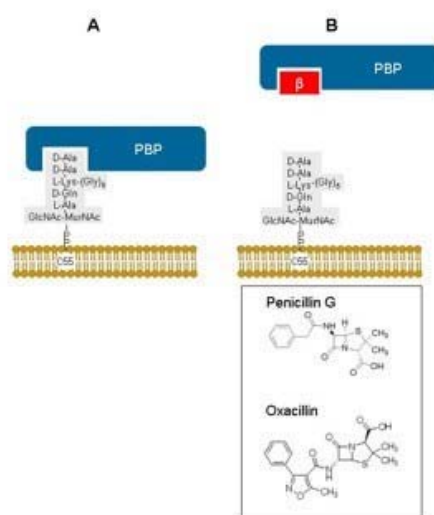


Figura 1.23. Mecanisme d'acció de les penicil·lines. Interrupció de la síntesi de la paret bacteriana.

1.6.7.3. Resistència bacteriana

Algunes bactèries han desenvolupat resistència a les penicil·lines. Els mecanismes de resistència bacteriana a les penicil·lines poden ser de 3 tipus: Producció de β -lactamases, modificació de centres en les PBP, o bloqueig de l'entrada a través de la membrana bacteriana.

a. Producció de β -lactamases

La producció de β -lactamases és el mecanisme de resistència bacteriana més important. Les β -lactamases són enzims que hidrolitzen els anells de β -lactama dels antibiòtics fent-los inactius (**Figura 1.24.**). La penicil·linasa va ser la primera β -lactamasa en ser identificada. Va ser aïllada per Abraham i Chain al 1940 d'una *E. coli* Gram negatiu abans que la penicil·lina comences a utilitzar-se clínicament. La producció de penicil·linases es va estendre ràpidament en bactèries que abans no en produïen o rarament ho feien.

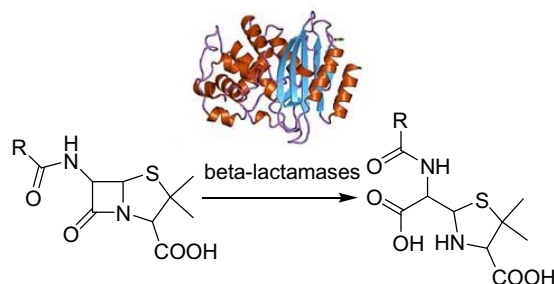


Figura 1.24. Mecanisme d'acció de les β -lactamases. Obertura de l'anell β -lactàmic.

b. Modificació dels centres de les BPO

Un mecanisme molt comú de les bactèries Gram negatives és la producció de PBP amb menys afinitat per les β -lactames (**Figura 1.25.**). La resistència més característica d'aquest mecanisme s'observa en l'*Stafilococ aureus* envers la meticil·lina. La meticil·lina té molta afinitat per les PBP2, on la seva unió genera finalment una lisi de les cèl·lules de bactèries. Però una soca d'aquestes bactèries ha generat una PBP2a que té molta menys afinitat per la meticil·lina, fent resistent a la bactèria en front d'aquesta penicil·lina.

L'enterococ té una resistència natural a les penicil·lines perquè una de les seves PBPs, la PBP5 té una menor afinitat a la unió amb les penicil·lines. El pneumococ té mutacions que també el fan resistent a les β -lactames. Han alterat tres dels seus PBPs per a evitar la unió de les β -lactames. Els canvis han estat tan elevats que se sospita que el gen ha estat obtingut d'una altra bactèria. Un efecte similar presenten les bactèries *Haemofilus* i *Neisseria*.

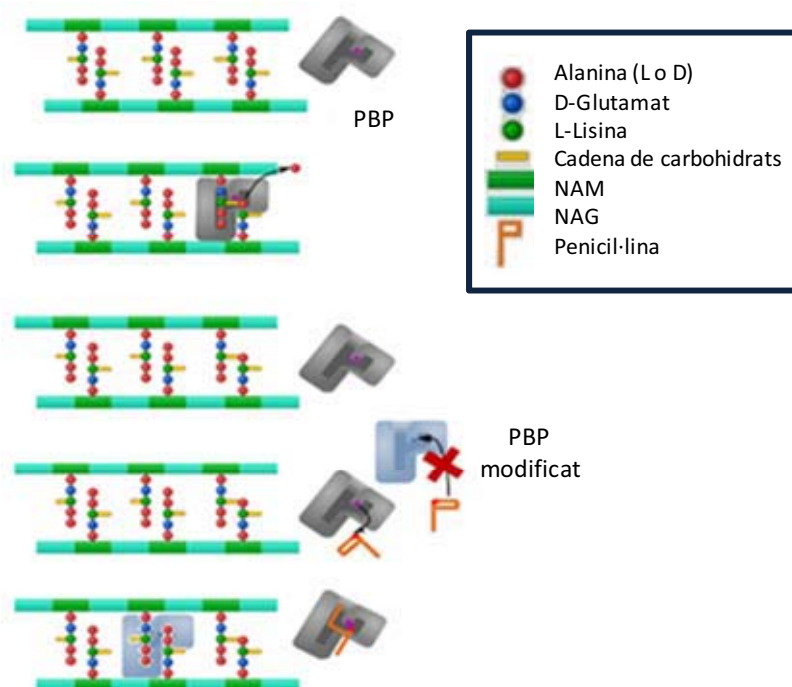


Figura 1.25. Modificacions en les PBP de les bactèries que disminueixen l'afinitat per les penicil·lines.

c. Bloqueig de l'entrada

Les penicil·lines arriben fins les PBPs a través de les parets i les membranes plasmàtiques. Això es molt assequible en bactèries Gram positives però no tant en les bactèries Gram negatives, ja que, com ja s'ha mencionat anteriorment, en les bactèries Gram

negatives la internalització del fàrmac és a través dels porus. És per això que les bacteries Gram negatives han desenvolupat una resistència a les β -lactames modificant o eliminant aquests porus. Aquest tipus de resistència s'observa en enterobactèries com la *Salmonella*, *Enterobacter* i les *Pseudomonas* (Figura 1.26.).

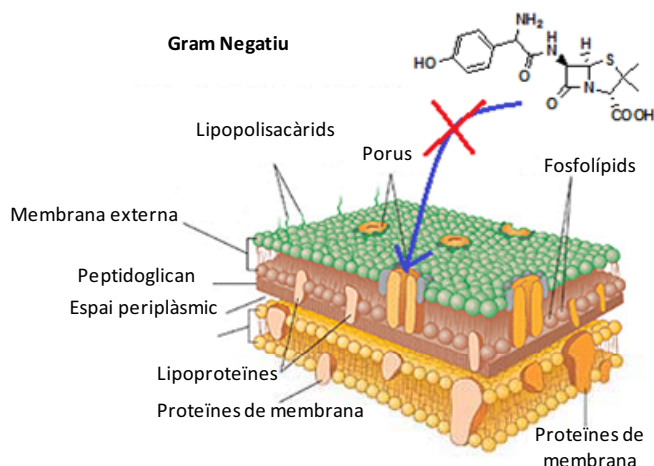


Figura 1.26. Bloqueig de l'entrada de penicil·lines a través de porus en bacteris Gram negatiu.

1.6.7.4. Producció de penicil·lines

Les penicil·lines naturals les produeixen certes soques de fongs com el *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium notatum* i el *Acremonium chrysogenum*. Algunes d'aquestes soques creixen en tancs profunds amb les precaucions necessàries per evitar la contaminació bacteriana. S'afegeix àcid fenilacètic per incrementar el rendiment de la producció de la benzilpenicil·lina. El producte final s'obté mitjançant una simple cristal·lització. Mitjançant el mateix mètode, però enriquint els cultius amb compostos químics específics, s'obtenen altres compostos derivats de l'àcid penicil·lànic poden ser preparats. També es possible modificar la benzilpenicil·lina després d'haver estat sintetitzada amb simples reaccions químiques. Des del 1959 ha estat possible la síntesi de nombrosos compostos afegint diferents cadenes laterals al nucli penicil·línic (àcid 6-aminopenicil·lànic). S'estima que el consum d'antibiòtics β -lactàmics és al voltant del 65% del mercat mundial d'antibiòtics [126].

1.6.7.5. Mètode de detecció de penicil·lines

a. Cromatografia

Hi ha una àmplia varietat de mètodes per a la detecció de penicil·lines, però els únics mètodes permesos per la comissió EU són els cromatogràfics. La cromatografia implica passar una mescla a través d'una fase estacionària, que separa l'analit d'altres molècules basant-se en el coeficient de partició entre la fase mòbil i la fase estacionària. Essencialment, l'analit es mou a través de la columna (cromatografia de gasos o cromatografia líquida d'alta eficàcia), i ho fa en funció de la mida, la polaritat i el dissolvent utilitzat. Quan l'analit surt de la columna es detecta per un sistema espectromètric, que pot ser del tipus UV/visible, fluorescència, espectrometria d'IR i espectrometria de masses. Hi ha molt exemples en la literatura de detecció cromatogràfica de penicil·lines [127-129]. La detecció de penicil·lines per cromatografia permet quantificar l'analit, però per contra cal fer un tractament previ de la mostra molt elaborat, requereix de personal qualificat, són mètodes cars i necessiten de llargs períodes de temps per analitzar diverses mostres.

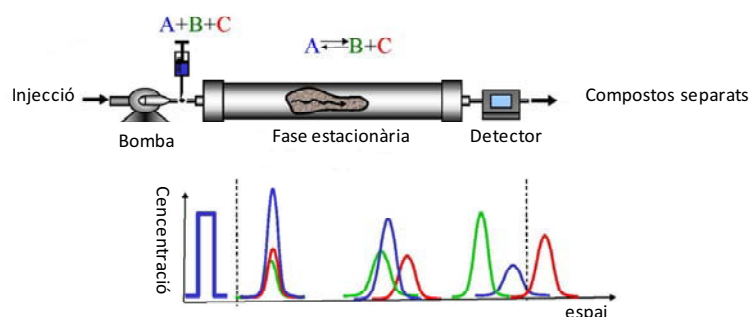


Figura 1.27. Representació d'un sistema cromatogràfic de detecció de penicil·lines.

b. Mètodes de detecció ràpida

La cromatografia és cara, es perd bastant temps i requereix aparells especials i treballadors qualificats. Altres mètodes de detecció més ràpids han estat desenvolupats per a la detecció de penicil·lines en llet. Un resum d'aquests mètodes s'inclou en l'informe de l'any 2010 de la Federació Internacional de Lleteria (IDF).

Alguns exemples són els immunoassaigs i els tests d'inhibició microbiana. Els grans avantatges d'aquests mètodes són que permeten fer la mesura de moltes mostres en poc

temps, són econòmics, són tècniques senzilles d'utilitzar i no cal un tractament previ de la mostra. A més, en molts casos són molt útils per fer mesures de camp, ja que ocupen poc espai i són transportables, com és el cas dels assaigs en tira o de flux lateral. Però en general són mètodes qualitius o semi-quantitatius com és el cas dels immunoassaigs. Gràcies a la seva senzilla manipulació s'han desenvolupat molts test comercials d'aquests tipus per la de detecció de penicil·lines en llet. Alguns d'aquests mètodes es descriuen a continuació:

- **Test d'inhibició microbiana**

El nivell de penicil·lines en una mostra pot ser determinat pels efectes inhibitoris en bactèries. Les soques més utilitzades són les *Bacillus stearothermophilus*. Les espores de les bactèries es mantenen en una matriu de gel d'agar que conté nutrients i un indicador de pH. La llet s'afegeix al damunt i el gel s'incuba a la temperatura ideal per a que les espores germinin i creixin. Quan creixen fan que el medi esdevingui àcid i per tant que s'aprecii un canvi de color. En presència de l'antibiòtic hi ha una inhibició del color. Alguns exemples d'aquests tests són el Delvotest® (DSM, Països Baixos) i el test Charm Blue-Yellow (CharmScience, USA). Aquests tests poden realitzar-se en poques hores però requereixen incubadors. A més són assajos molt poc selectius, ja que qualsevol antibiòtic pot inhibir el creixement d'aquestes espores.

- **Assaigs basats en receptors. Dispositius de flux lateral**

Els dispositius de flux lateral són sistemes senzills que pretenen detectar la presència o absència d'un analit en una mostra concreta dintre d'uns límits determinats (MRL). No necessiten un equipament costós ni personal qualificat. En el cas concret de les penicil·lines, s'utilitza la penicil·linasa com a receptor, la qual es troba conjugada a partícules d'or. Aquestes partícules s'incuben en una mostra de llet, i les penicil·lines presents en la mostra s'uneixen a les partícules. La mescla resultant s'afegeix a l'extrem d'una membrana de nitrocel·lulosa, en la qual hi ha adsorbida una línia d'un derivat proteic de les penicil·lines (antigen). Com que la mostra flueix per capil·laritat a través de la membrana, quan les partícules es troben la línia de l'antigen, aquestes es queden atrapades. La intensitat final del color és proporcional a la quantitat d'antibiòtic present. Sempre es compara el color amb una segona línia o línia de control (**Figura 1.28.**). L'assaig és molt ràpid, en tres o quatre minuts n'hi ha suficient, i a nivell semiquantitatiu si es volen interpretar els resultats, es necessita un lector especialitzat. Alguns exemples d'aquest tests són el UniSensor® (Bèlgica) i el BetaStar® (Neogen, USA).

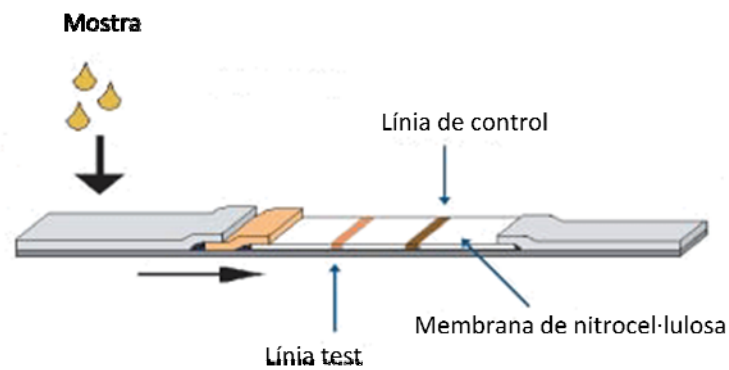


Figura 1.28. Representació d'un sistema de flux lateral per determinar la presència d'amoxicil·lina en una mostra de llet.

- **Assaig radiomarcats**

Aquests assaigs utilitzen bacteries amb receptors marcats i específics a penicil·lines. La mostra es mescla amb la bactèria a una determinada quantitat de penicil·lina marcada amb C14. Es mesura la quantitat de penicil·lines marcades amb C14 unides al receptor. A major resposta menor és la quantitat de penicil·lina en la mostra. Aquest test requereix equipament especial i personal qualificat. Un exemple de test comercialment disponible és el Charm II BetaLactam (Sequential) Test® (CharmSciences, USA).

- c. **Assaigs immunoenzimàtics (ELISA)**

Degut a la versatilitat que presenten aquests tipus d'assaigs, tant a la literatura científica com comercialment s'ha intentat desenvolupar diferents formats. En línies generals, els ELISA poden quantificar de manera simultània gran quantitat de mostres, de forma ràpida i senzilla, i moltes vegades sense tractament de mostra o un tractament molt simple. A part, al treballar amb immunoreactius, els assajos resultants acostumen a ser molt sensibles i específics.

Hi ha diversos articles publicats que han desenvolupat ELISAs per a la detecció d'amoxicil·lina o altres penicil·lines en llet. En resum, molts d'ells són poc sensibles i poc específics. En la **Taula 1.12.** s'observa un resum de tots aquestes publicacions.

Al 2001 P. Cliquet *et al.*[130] va descriure alguns mètodes d'unió d'ampicil·lina a diferents proteïnes (BSA, OVA i tiroglobulina). Es van aplicar diversos mètodes de conjugació utilitzant espaiadors diferents, carbodiimida com a agent acoblant i sense cap mediador químic. Amb aquest immunògens es van obtenir anticossos monoclonals. L'especificitat i

afinitat dels diferents anticossos es va demostrar amb un assaig d'inhibició, però es necessitava una concentració major de 3.6 µg/L per a obtenir una competició del 50% en l'ELISA competitiu.

Samsonova *et al.* [131] van desenvolupar un immunoassaig indirecte per a la detecció d'ampicil·lina en llet, amb detectabilitats en l'interval entre 10-1000 µg/L. Els anticossos policlonals eren específics per ampicil·lina i tenien poca reactivitat creuada amb altres penicil·lines.

Recentment, Zhang *et al.* [132] han desenvolupat un immunoassaig per la detecció de l'àcid benzilpeniciloic en llet. Aquest àcid és un producte de degradació de la Penicil·lina G que pot ser trobat en llet que ha estat dopada amb β-lactamases per evitar la detecció de la Penicil·lina G.

En general s'observa que els anticossos descrits per la detecció de penicil·lines són poc sensibles. Cal recordar que els MRLS per penicil·lines són de l'ordre de 4 µg/L en llet. En el cas concret de l'amoxicil·lina, l'antibiòtic més utilitzat avui dia, encara no s'ha aconseguit produït un anticòs prou sensible com per arribar a detectar-la a nivells de MRL. Sembla ser que els assajos més sensibles, s'obtenen quan s'intenten detectar les β-lactames amb l'anell en forma oberta, és a dir, els àcids peniciloics.

Taula 1.12. Immunoassaigs descrits a la bibliografia per la detecció de penicil·lines.

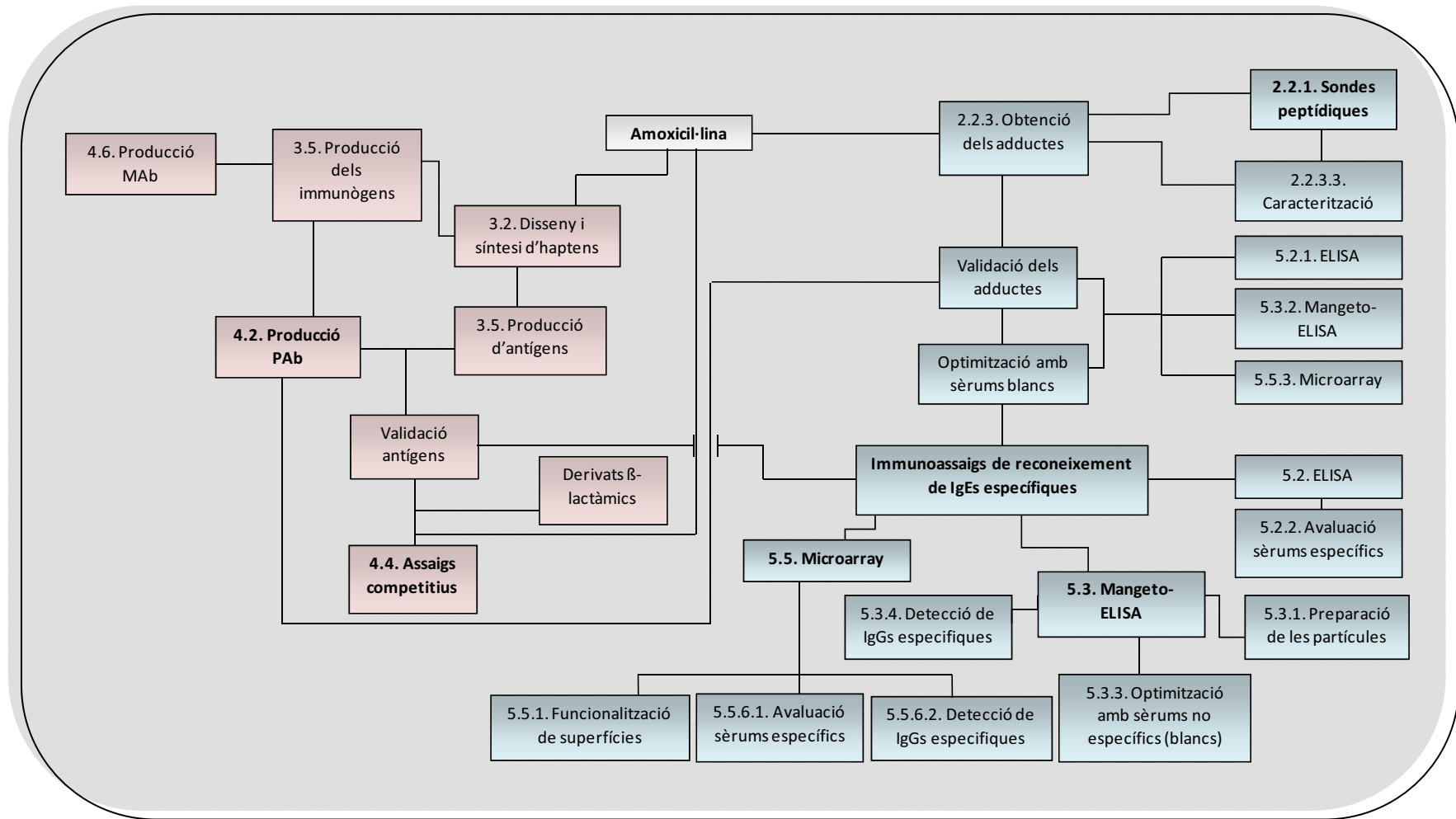
Tipus	Anàlit	Immunogen	IC ₅₀ (µg/L)	Reactivitat creuada	Referència
FIA	Ampicil·lina	Tioglobulina bovina – glutaraldehid-ampicil·lina	2.9		[133]
FIA	Penicil·lina G	6-APA-hemocianina	30		[134]
ELISA	Ampicil·lina	Penicil·lina-proteïna a través de carbodiimida Penicil·lina- ester de succinimida- proteïna Penicil·lina-glutaraldehid-proteïna Ampicil·lina-BSA	3,5	Penicil·lina G	[130]
ELISA	Ampicil·lina	Ampicil·lina-BSA a través de carbodiimida	62	Penicil·lina G (10%)	[131]
ELISA	Penicil·lina G	Ampicil·lina-BSA	2.4	Ampicil·lina 64% Amoxicil·lina 24%	[135]
ELISA	Ampicil·lina		2	Penicil·lina V 22% Anell obert de la ampicil·lina 4%	[136]
ELISA	Àcid benzilpenicil·lòic	Àcid benzilpenicil·lòic – KLH	0.3	Poca reactivitat creuada	[132]
ELISA	Àcid benzilpenicil·lòic Penicil·lina G	Àcid benzilpenicil·lòic –BSA Penicil·lina G-HRP	3.2 2	Penicil·lina G 100% Penicil·lina V 96% Ampicil·lina 85% Amoxicil·lina 29%	[137]
ELISA	Àcid benzilpenicil·lòic Cloxacil·lina	Àcid benzilpenicil·lòic - BSA	0.05 0.1		[138]
ELISA	Amoxicil·lina Forma oberta de l'ampicil·lina	Ampicil·lina-proteïna conjugates	10 0.08		[139]
Microarray	Penicil·lina G Ampicil·lina Cloxacil·lina	Ampicil·lina-(glutaraldehid)-KLH	24.6 173 3.9	Amoxicil·lina 187 % Penicil·lina G 31 % Cloxacil·lina 30 % Dicloxacil·lina 44 % Oxacil·lina 14 %	[140]

1.7. Objectius

Considerant que el treball desenvolupat durant aquesta Tesi Doctoral es centra en el marc d'un projecte nacional (β -array) i d'un projecte europeu (Confidence), es van proposar els següents objectius:

1. Desenvolupar un sistema de diagnòstic *in vitro* que permeti detectar IgEs específiques de pacients al·lèrgics a penicil·lines, utilitzant simultàniament el major nombre possible de determinants antigènics β -lactàmics amb la mínima quantitat de sèrum. Per poder assolir aquest objectiu serà necessari sintetitzar, aïllar i caracteritzar nous determinants antigènics penicil·línics per poder finalment desenvolupar l'assaig.
2. Per tal de prevenir l'aparició de reaccions adverses a penicil·lines a través de la ingesta d'aliments contaminats, es proposa desenvolupar un immunoassaig per detectar amoxicil·lina en mostres de llet. Un disseny racional de l'immunogen permetrà la producció d'anticossos específics, els quals s'utilitzaran en el desenvolupament de l'assaig.

DISCUSSIÓ DE RESULTATS



4.6. Producció MAb

3.5. Producció dels immunògens

3.2. Disseny i síntesi d'haptens

Amoxicil·lina

4.2. Producció PAb

3.5. Producció d'antígens

Validació antígens

Derivats β -lactàmics

4.4. Assaigs competitiu

2.2.3. Obtenció dels adductes

2.2.1. Sondes peptídiques

2.2.3.3. Caracterització

Validació dels adductes

5.2.1. ELISA

5.3.2. Mangeto-ELISA

5.5.3. Microarray

Optimització amb sèrums blancs

Immunoassaigs de reconeixement de IgEs específiques

5.2. ELISA

5.2.2. Avaluació sèrums específics

5.5. Microarray

5.3. Mangeto-ELISA

5.3.1. Preparació de les partícules

5.3.4. Detecció de IgGs específiques

5.3.3. Optimització amb sèrums no específics (blancs)

5.5.1. Funcionalització de superfícies

5.5.6.1. Avaluació sèrums específics

5.5.6.2. Detecció de IgGs específiques

2. Disseny i síntesi de sondes peptídiques per a la utilització en diagnòstic clínic

2.1. Introducció a la síntesi de pèptids en fase sòlida

La síntesi de pèptids en fase sòlida (SPPS) va ser desenvolupada per Merrifield l'any 1963 [141] i ha esdevingut una de les metodologies més habituals i senzilles per a obtenir pèptids a nivell de laboratori.

Aquesta metodologia consisteix en ancorar el primer aminoàcid de la seqüència peptídica a un suport polimèric insoluble, protegit tant en el grup $\text{NH}_2\text{-}\alpha$ com en la cadena lateral, si s'escau. El grup protector del $\text{NH}_2\text{-}\alpha$ ha de ser ortogonal o compatible amb el grup protector de la cadena lateral de l'aminoàcid. Per tal de fer créixer la cadena peptídica cal eliminar el grup protector del $\text{NH}_2\text{-}\alpha$, i addicionar seqüencialment els aminoàcids convenientment protegits emprant un agent acoblant. Aquest agent acoblant actuarà com a activador del grup $\text{COOH-}\alpha$ o bé preactivant l'aminoàcid protegit. El mètode sintètic que s'acaba de descriure transcorre des de l'extrem C-terminal cap a l'extrem N-terminal del pèptid i és el que s'utilitza més habitualment en la síntesi de pèptids en fase sòlida.

Un cop s'obté el pèptid complet ancorat a la resina, es duu a terme el desancoratge del pèptid. L'extrem C-terminal del pèptid es pot obtenir en forma d'àcid o amida, depenent del tipus de funcionalització de la resina utilitzada. Normalment, els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids es seleccionen de tal manera que pugin ser eliminats simultàniament al desancoratge del pèptid de la resina (**Figura 2.1**).

La síntesi en fase sòlida, tant de pèptids com d'altres molècules orgàniques, presenta múltiples avantatges respecte la síntesi en solució. Les més importants es presenten a continuació:

- a) El fet de tenir el pèptid unit a un suport sòlid permet utilitzar excessos de reactius per aconseguir elevats rendiments en les reaccions d'acoblament.

- b) Els excessos de reactius i els possibles subproductes solubles que es pugin formar són molt fàcilment eliminables per filtració i rentat de la resina.
- c) No cal dur a terme la purificació dels intermedis peptídics.
- d) El procés es pot automatitzar.
- e) Els grans de resina poden actuar com a “micro-reactors”, de tal manera que es poden preparar un gran nombre de compostos simultàniament per mètodes de química combinatòria.

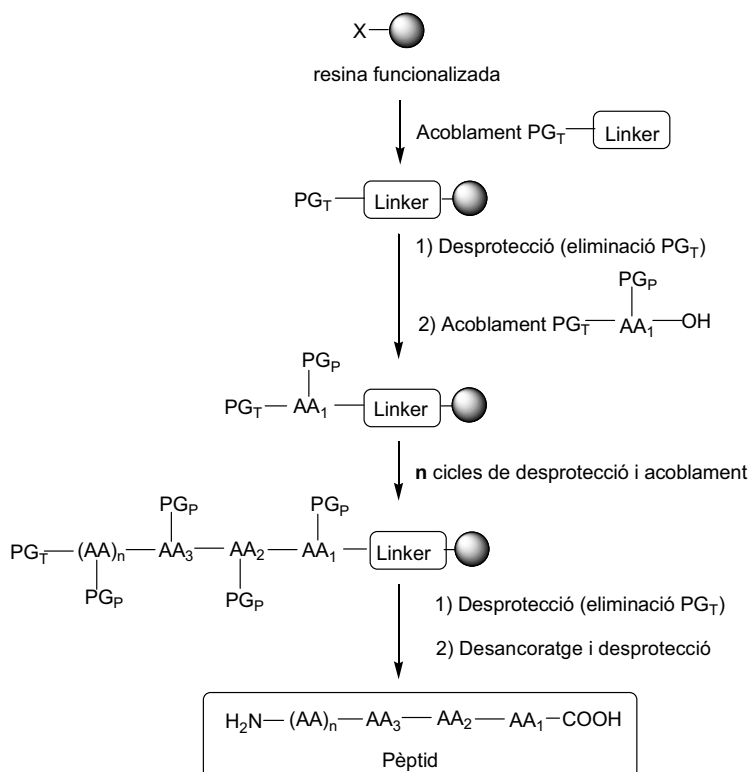


Figura 2.1. Esquema general de la SPPS, on PG_T = Grup protector temporal, PG_P = grup protector permanent, AA = Aminoàcid, linker = espaiador bifuncional.

A continuació, es detallaran els aspectes i elements químics més importants de la SPPS, com són els suports polimèrics, les estratègies de protecció, els reactius d'acoblament i els mètodes acidolítics per a dur a terme el desancoratge dels peptídics del suport polimèric.

2.1.1. El suport polimèric

El suport polimèric o resina ha de ser químicament inert a les condicions utilitzades durant la síntesi, ha de ser estable mecànicament i completament insoluble en els dissolvents

emprats. S'han desenvolupat una gran varietat de resines per a la SPPS [142] [143], però actualment s'utilitzen bàsicament tres tipus de suports polimèrics:

- Resines de poliestirè (PS) reticulat amb un 1% de 1,4-divinilbenzè (DVB), i funcionalitzades o derivatitzades convenientment, com per exemple la 4-metilbenzidrilamina (MBHA) [144], hidroximetilpoliestirè (HMPS) [145], clorur de 2-clorotrilpoliestirè (Cl-Trt) [146, 147], clorometilpoliestirè (resina de Merrifield) [148, 149] ó aminometilpoliestirè (AMPS) [150]. Aquestes resines es solvaten bé en dissolvents no polars com el toluè o el DCM [151], i també es poden utilitzar dissolvents més polars com DMF, dioxà o THF.
- Resines de poliamida. Sheppard i col·laboradors [152, 153] van desenvolupar una resina de poliamida amb la idea de que potser la síntesi dels pèptids seria més eficient si el suport polimèric fos químicament més semblant a les cadenes peptídiques. Aquest suport polimèric va sorgir com alternativa a les resines de poliestirè, i consisteix en polidimetilacrilamida reticulada amb cadenes d'èster metílic de sarcosina. Aquests esters metílics es poden modificar per tractament amb etilendiamina, proporcionant els grups amino primaris com a punt d'ancoratge a la resina[154]. Les resines de poliamida es solvaten bé i augmenten 10 vegades el seu volum respecte a la mida original en DMF, H₂O o MeOH [142]. En canvi, es solvaten menys en DCM [142].
- Resines que incorporen cadenes de polietilenglicol (PEG). D'entre les quals es poden distingir tres tipus:
 - a) PEG-PS: les cadenes de PEG es troben unides covalentment a un suport de poliestirè (PEG-PS). Les primeres resines comercials van ser desenvolupades per Zalipsky, Albericio i Barany (PEG-PS) [155, 156] i Bayer i Rapp (TentaGel®) [157, 158]. La idea de desenvolupar la resina PEG-PS va ser combinar un cor hidrofòbic de PS amb cadenes hidrofíliques de PEG en el mateix suport, el que permet que aquestes resines siguin compatibles tant amb dissolvents polars com amb apolars [159]. Un exemple de resina que utilitza aquest suport polimèric és la NovaPEG Wang Resin de Novabiochem®.
 - b) PEG-acrilamida: Meldal[160] va dissenyar una sèrie de resines de PEG combinades amb poliamida. La resina d'aquest tipus més àmpliament utilitzada és la PEGA, que s'obté per polimerització de bis-2-aminopropilpolietilenglicol amb clorur d'acrilòil. Aquesta resina es solvata bé en una gran varietat de dissolvents, des d'H₂O a toluè.

- c) Completament PEG (100% PEG): les resines basades totalment en PEG estan constituïdes principalment per enllaços de tipus èter. Côte[161] va desenvolupar la resina ChemMatrix®, la qual degut a la seva elevada reticulació posseeix una major estabilitat mecànica respecte a altres resines de PEG. Aquesta resina es solvata bé en tots els dissolvents més comuns, i per tant, pot ser útil per a una gran varietat de síntesis orgàniques. La resina ChemMatrix® permet realitzar satisfactòriament la síntesi de pèptids complexos, altament estructurats o bé que poden formar agregats, de pèptids llargs i de proteïnes petites.

Per tal de poder desenvolupar satisfactòriament una síntesi sobre un suport polimèric és imprescindible una bona solvatació de la resina. A més, cal escollir molt acuradament la funcionalització d'aquesta per tal de tenir una bona unió amb el primer aminoàcid. La funcionalització de la resina determinarà l'estratègia sintètica a seguir i la naturalesa de l'extrem C-terminal del pèptid. El primer aminoàcid es pot unir directament a la resina funcionalitzada, o bé, es poden utilitzar espaiadors bifuncionals que s'incorporen entre la resina i el primer aminoàcid [162-164].

2.1.2. Estratègies de protecció

Els dos grups protectors més habituals del grup $\text{NH}_2\text{-}\alpha$ d'un aminoàcid són el *terc*-butoxicarbonil (Boc) i el 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc). Aquest tipus de protecció és temporal perquè s'elimina successivament durant la síntesi, mentre que els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids són de tipus semipermanent, ja que han de restar intactes durant la síntesi per tal d'evitar reaccions secundàries. Per tant, un punt clau en la síntesi de pèptids es definir una bona estratègia de protecció dels aminoàcids tenint en compte que s'han de poder eliminar en condicions diferents, és a dir, que han de ser ortogonals.

Les estratègies de síntesi a seguir poden ser la Fmoc/^tBu o la Boc/Bzl en funció dels grups protectors escollits.

L'estratègia Fmoc/^tBu es caracteritza perquè el grup protector del grup $\text{NH}_2\text{-}\alpha$ dels aminoàcids és el Fmoc i es làbil a bases. El més habitual és la eliminació amb tractament amb piperidina. Els grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids són de tipus *terc*-butil (^tBu), i s'eliminen durant el desancoratge del pèptid per tractament amb TFA (**Figura 2.2.**). Pel contrari, l'estratègia Boc/Bzl utilitza el grup Boc com a protector del grup $\text{NH}_2\text{-}\alpha$ dels

aminoàcids que és làbil a àcids, i grups benzílics (Bzl) per protegir les cadenes laterals que s'eliminen simultàniament al desanoratge del pèptid per tractament amb HF anhidre (**Figura 2.2.**)

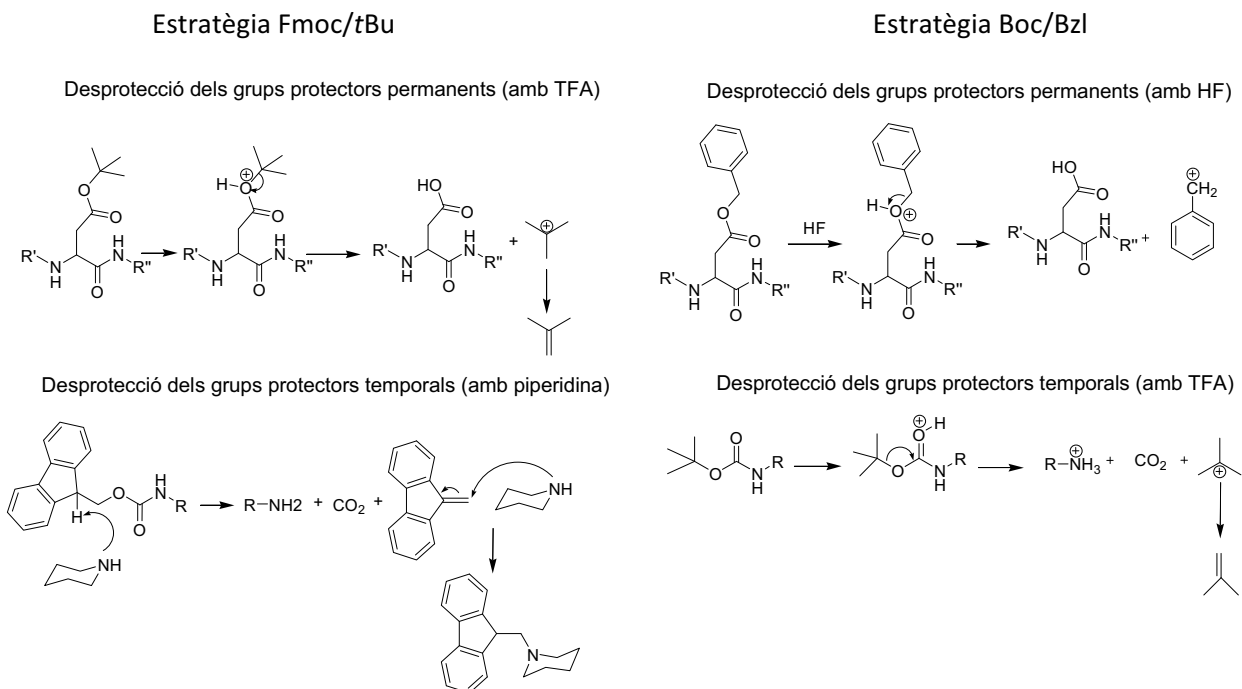


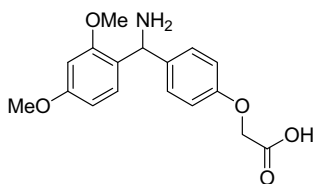
Figura 2.2. Mecanismes d'eliminació dels grups protectors en les estratègies Fmoc/tBu i Boc/Bzl.

En el cas de l'estratègia de síntesi Fmoc/tBu, normalment per a obtenir bons rendiments durant el procés de desprotecció i desanoratge del pèptid del suport polimèric sota condicions acidolítiques suaus, és necessari incorporar una molècula intermèdia entre el suport polimèric i el primer aminoàcid de la seqüència peptídica anomenada espaiador bifuncional ("linker").

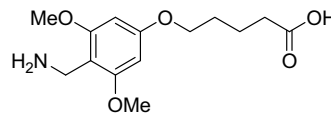
Els espaiadors bifuncionals presenten dos grups funcionals un dels quals s'enllaça amb la resina de manera estable i l'altre s'enllaça al primer aminoàcid mitjançant un enllaç làbil a les condicions de desprotecció i desanoratge desitjades. En funció de la reactivitat d'aquest enllaç, es poden emprar diferents condicions de reacció per a desancorar el pèptid de la resina, com són l'acidòlisi suau[165, 166], l'eliminació per bases[143] o el desplaçament nucleòfil [143].

Els espaiadors més comuns són els alcohols benzílics i amines benzíliques (**Figura 2.3.**), que permeten obtenir els pèptids en forma d'àcids o amides respectivament, i generalment amb elevada puresa i rendiment.

Pèptids amb C-terminal carboxamida

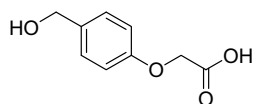


Àcid 2-(4-aminometil-(2',4'-dimetoxifenil))fenoxiacètic (Rink) [167]

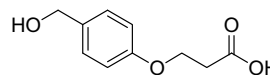


Àcid 5-(4-aminometil-3,5-dimetoxifenoxi)valèric (PAL) [168]

Pèptids amb C-terminal àcid carboxílic



Àcid 4-hidroxiimetilfenoxiacètic (HMPA)



Àcid 3-(4-hidroxiimetilfenoxi)propioníc (HMPP) [169]

Figura 2.3. Espaiadors bifuncionals utilitzats en l'estratègia Fmoc/tBu.

Per a obtenir pèptids amb l'extrem C-terminal en forma carboxamida o àcid seguint l'estratègia de síntesi Boc/Bzl no es poden fer servir espaiadors bifuncionals, degut a que l'enllaç d'unió del pèptid amb l'espaiador no resisteix els tractaments successius amb TFA. Una excepció és l'espaiador 4-(oximetil)-fenilacetamidometil (PAM) [170] (**Figura 2.4.**) conjuntament amb la resina de aminometilpoliestirè, ja que l'enllaç de tipus ester que es forma entre l'aminoàcid i aquest espaiador és 100 vegades més estable que la d'un ester benzílic convencional en condicions àcides (només es detecta una pèrdua del 0.007 % de pèptid per cicle d'eliminació del grup Boc).

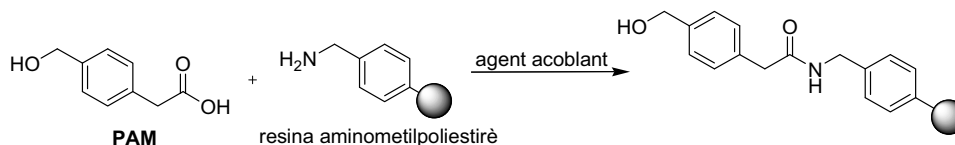


Figura 2.4. Espaiador bifuncional PAM utilitzat en l'estratègia Boc/Bzl.

2.1.3. Elongació de la cadena peptídica: reactius d'acoblament

Per tal d'obtenir un rendiment pràcticament quantitatiu de la formació de l'enllaç amida, és necessària l'activació del grup COOH- α de l'aminoàcid protegit, i així l'atac nucleòfil del grup NH₂- α estigui afavorit. Cal escollir molt bé el grup activant del COOH- α ja que no només es pretén aconseguir un molt alt rendiment en la reacció d'acoblament, sinó que també evitar les reaccions secundàries associades a l'activació, com ara la racemització [171].

Els reactius més clàssic i àmpliament utilitzats com agents activants del grup COOH- α d'un aminoàcid són les carbodiimides, entre les quals la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) [172, 173], utilitzada des dels inicis de la tècnica de la fase sòlida, i la *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI o DIC) [174, 175], que comporta més avantatges que la DCC degut a que la urea que es genera com a subproducte de la reacció és molt més soluble en els dissolvents habituals (**Figura 2.5.**).

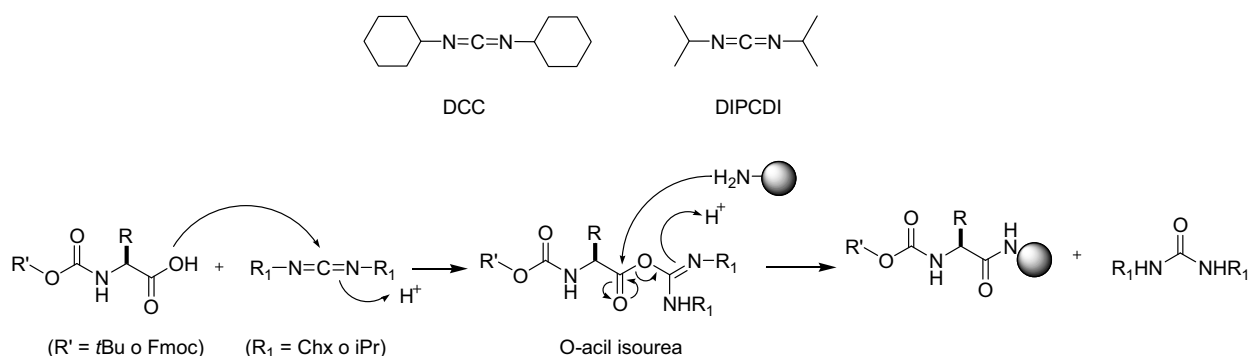


Figura 2.5. Mecanisme d'acoblament en SPPS emprant carbodiimides.

La utilització de carbodiimides per a l'activació del grup carboxílic presenta alguns problemes, a causa de les reaccions secundàries que poden aparèixer a partir de l'intermedi, *O*-acil isourea, que es genera. Algunes d'aquestes reaccions poden ser la transposició d'*O*-acil a *N*-acil isourea (**Figura 2.6.**), o bé la racemització per enolització de l'*O*-acil isourea que condueix a la formació de la 5(4H)-oxazolona (**Figura 2.6.**).

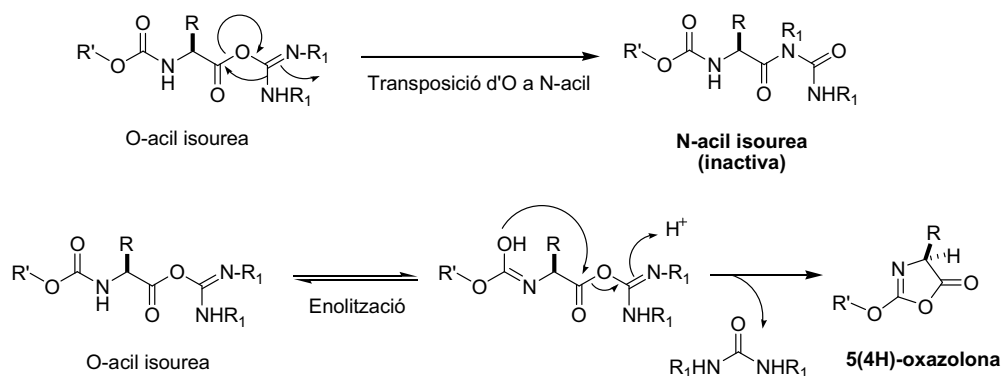


Figura 2.6. Reaccions secundàries que poden tenir lloc durant l'activació amb carbodiimides.

Per tal de minimitzar aquestes reaccions secundàries s'introdueixen additius a la mescla de reacció, tal com l'1-hidroxibenzotriazole (HOBt) [176] i l'1-hidroxi-7-azabenzotriazole (HOAt) [177, 178]. Aquests additius reaccionen amb l'espècie O-àcil isourea donant lloc a un éster actiu d'HOBt o HOAt que minimitza la racemització i accelera la reacció d'acoblament (**Figura 2.7.**).

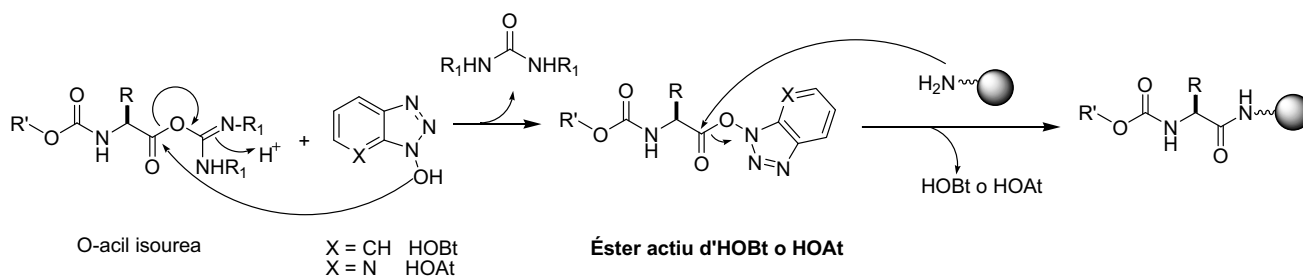
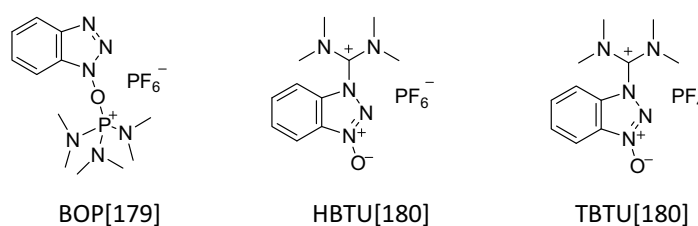


Figura 2.7. Activació de l'àcid carboxílic emprant els additius HOBt i HOAt.

A partir de l'HOBt i l'HOAt s'han desenvolupat una gran varietat d'additius en forma de sals de fosfoni i d'uroni. Aquests agents acoblants són molt més reactius que les carbodiimides i això fa que s'utilitzin molt habitualment en SPPS. Alguns exemples es poden observar en la **Figura 2.8.**



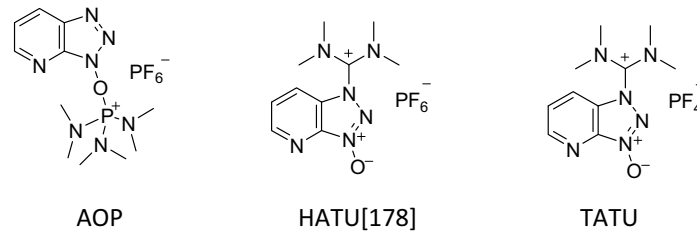


Figura 2.8. Sals de fosfoni i d'uroni derivades de l'HOBt i l'HOAt.

A diferència de les carbodiimides, les sals de fosfoni i d'uroni reaccionen amb l'aminoàcid en forma de carboxilat, es per això que cal utilitzar una base en la reacció. Típicament s'utilitza una amina terciària impedita com és la DIEA.

Un avantatge adicional d'aquests reactius és que com que inclouen en la seva estructura els additius HOBt ó HOAt, aquests actuen com a grup sortint quan les sals de fosfoni o d'uroni reaccionen amb el carboxilat de l'aminoàcid, donant lloc a una espècie activa que reacciona amb el grup NH₂ de la cadena peptídica en creixement (**Figura 2.9.**).

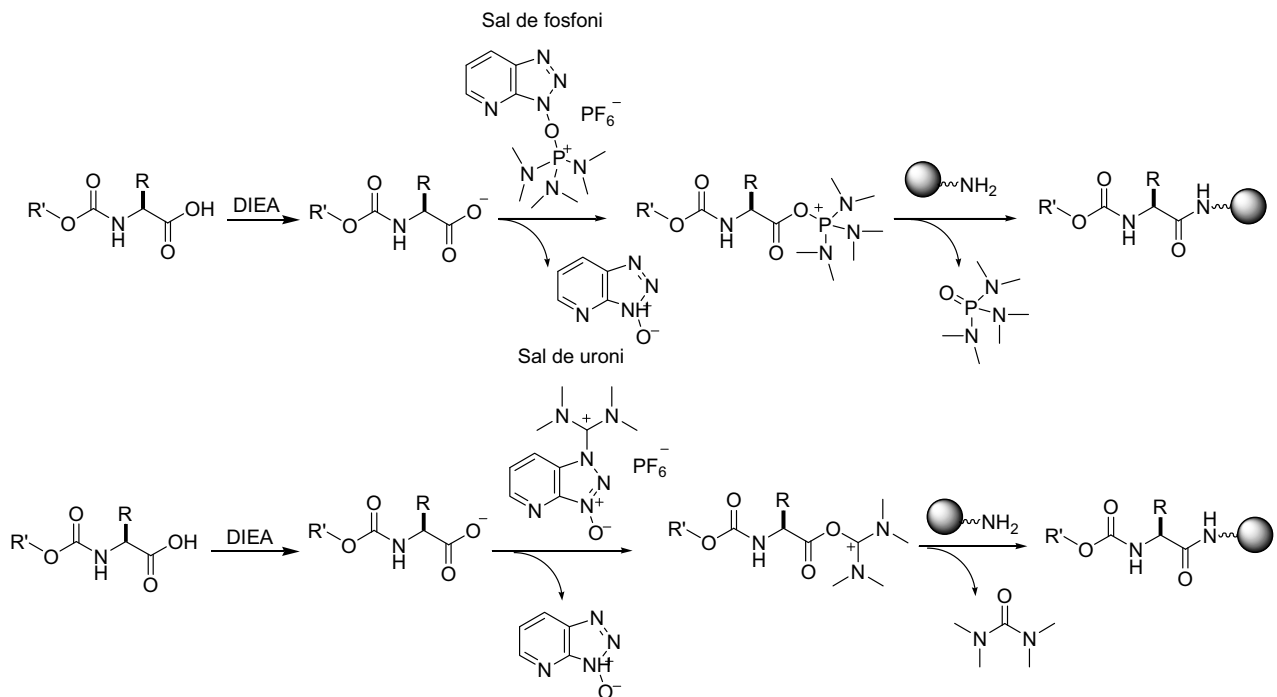


Figura 2.9. Mecanisme d'acoblament amb sals de fosfoni i d'uroni.

2.1.4. Desprotecció i desancoratge de pèptids de les resines seguint l'estratègia Fmoc/tBu

Com ja s'ha vist anteriorment, principalment existeixen dues estratègies per a la síntesi de pèptids en fase sòlida, Boc/Bzl i Fmoc/tBu. La metodologia Boc/Bzl es caracteritza per la

utilització d'àcids forts o de condicions acidolítiques enèrgiques per a desancorar el pèptid del suport polimèric. Normalment el HF anhidre és el mètode més utilitzat, tot i que també es pot usar TFMSA, TMSOTf o HBr. A escala de laboratori aquest mètode és molt eficient degut a que proporciona pèptids amb elevada puresa i rendiment, però a l'hora d'escalar el procés a nivell de producció industrial, el HF presenta una sèrie de limitacions importants ja que és un líquid volàtil (p.eb. = 19 °C), extremadament corrosiu i tòxic, que reacciona ràpidament amb el vidre, fent la seva manipulació complicada [181]. Totes aquestes mesures a adoptar tenen un cost econòmic bastant elevat, i a més, s'ha de tenir en compte que a escala de producció els temps de reacció s'allarguen, el que normalment condueix a una disminució tant dels rendiments com de la puresa dels productes.

En canvi en l'estratègia Fmoc/tBu utilitzant els espaiadors bifuncionals adequats, les condicions acidolítiques suaus amb TFA són suficients per a dur a terme l'eliminació dels grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids i l'escissió del pèptid del suport polimèric. Per aquest motiu és l'estratègia més àmpliament utilitzada tant a escala de laboratori com a escala de producció.

El TFA concentrat (95%) és el típic reactiu per dur a terme el desancoratge final de la resina i l'eliminació dels grups protectors de les cadenes. Durant aquesta reacció es poden generar carbocacions altament reactius que cal atrapar per evitar reaccions no desitjades. Normalment s'utilitzen capturadors de radicals lliures en la solució de desancoratge, com l'aigua o el DTE [182, 183].

2.2. Sondes peptídiques per al diagnòstic d'al·lèrgies

Les bases moleculars de les al·lèrgies produïdes per fàrmacs de poc pes molecular s'originen normalment quan l'al·lergen modifica una proteïna endògena. Un limitat número d'estudis han demostrat que la reactivitat intrínseca d'un determinat al·lergen farmacològic amb una proteïna aïllada varia àmpliament en funció de l'especificitat, els diferents mecanismes de reacció i la velocitat de reacció [184-187]. Normalment l'al·lergen actua com a electròfil i reacciona amb certs llocs nucleòfils de la proteïna. Degut a la gran complexitat experimental i analítica que suposa estudiar les interaccions proteïna-fàrmac, l'estratègia emprada en l'estudi d'aquestes reaccions consisteix en l'ús de seqüències peptídiques més simples per a fer els estudis de reactivitat [188, 189].

Recentment es troben diversos exemples de l'aplicació de sondes peptídiques per al diagnòstic d'al·lèrgies en el camp de la sensibilització cutània [190, 191]. En general s'utilitzen

sondes que contenen aminoàcids amb grups nucleòfils com la lisina (conté un grup amino) o la cisteïna (conté un grup tiol lliure) ja que a través d'aquests es poden generar adductes amb els al·lèrgens o els seus metabòlits [192, 193]. Troutman, *et. al.* van estudiar per cromatografia líquida acoplada a l'espectrometria de masses la reactivitat de 70 possibles al·lèrgens de contacte amb sondes peptídiques que contien lisines lliures i cisteïnes. A les 24 hores d'incubació es va trobar que 26 dels possibles al·lèrgens actuaven com a haptens, 19 com a pre-/pro-haptens i 25 no reaccionaven [194]. Seguint la mateixa estratègia s'ha estudiat la formació d'adductes amb dos forts al·lèrgens de contacte com és el 2,4-dinitroclorobenzè (DNCB) i la seva forma soluble en aigua l'àcid 2,4-dinitrobenzensulfonic (DNCBS). La detecció i quantificació per espectrometria de masses de la formació de l'adducte peptídic és dependent del grup tiol a tots els pHs possibles trobats a la pell humana [195].

En els últims anys s'ha trobat que la utilització de sondes peptídiques en el camp del diagnòstic d'al·lèrgies ha estat una eina molt útil per a conèixer millor quin tipus d'unió hi ha entre els fàrmacs, o les molècules petites en general, amb proteïnes endògenes, i en quant temps i en quines condicions ho fan. Es per això que en aquest treball es proposa utilitzar aquesta estratègia. Es pretén ampliar el coneixement estructural sobre els possibles al·lèrgens penicil·línics causants de les al·lèrgies i utilitzar-lo en l'àmbit del diagnòstic *in vitro* amb la finalitat de millorar la sensibilitat i l'especificitat dels sistemes de diagnòstic actuals.

2.2.1. Disseny de les sondes peptídiques

Tal i com s'ha mencionat en l'apartat anterior, per a que un fàrmac de poc pes molecular pugui generar una resposta immune és indispensable que s'uneixi a una proteïna endògena i modifiqui la seva estructura. Els diferents haptens derivats de les penicil·lines són generats sota condicions fisiològiques [196]. L'obertura de l'anell β -lactàmic, comú a totes les penicil·lines, genera el determinant penicil·loil o *determinant majoritari*, que rep aquest nom perquè es creu que representa un elevat percentatge de les formes haptèniques que es combinen irreversiblement amb proteïnes i que són finalment responsables de la major part de les reaccions d'hipersensibilitat immediata per aquest tipus de fàrmacs. La penicil·lina també degrada cap a altres determinants antigènics que reben el nom de *determinants minoritaris*. Entre aquests últims es poden mencionar el penicil·lenat, penamaldat o penicil·lamina entre d'altres (**Figura 2.10.**). En el moment de començar el projecte vam percebre que existien altres determinants, d'estructura desconeguda, que realment

dificultaven l'estudi d'aquestes reaccions a la vegada que impedièn el diagnòstic de manera apropiada.

En el cas de l'amoxicil·lina, només s'utilitza aïlladament el determinant antigènic majoritari corresponent a la forma oberta de l'anell β -lactàmic en els test de detecció d'IgEs específiques que hi ha avui dia al mercat. Però la baixa sensibilitat d'aquests test i la poca especificitat, especialment quan els nivells de IgEs totals són >500 kU/l [93, 94], fan sospitar que no només aquest epítop és el responsable de l'al·lèrgia. Aquest fet crea la necessitat de caracteritzar nous determinants antigènics i una bona manera de fer-ho és mitjançant l'ús de sondes peptídiques.

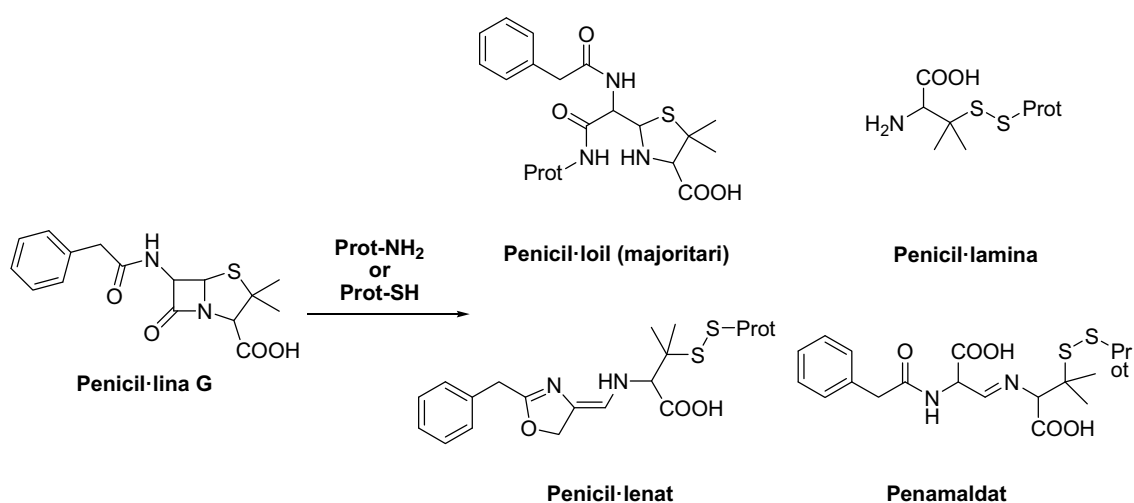


Figura 2.10. Determinants antigènics de la penicil·lina G.

Un dels primers reptes que van aparèixer en aquest treball va ser el disseny de la sonda peptídica que caldria utilitzar. Aquesta sonda havia de tenir 3 parts ben diferenciades. Primerament havia de ser capaç de capturar l'amoxicil·lina. Per aconseguir aquest propòsit un dels aminoàcids havia de tenir un grup reactiu en la seva cadena lateral (R_2), com ara la lisina (conté un grup amino), la serina (conté un grup alcohol) o la cisteïna (conté un grup tiol). Per una altra banda la sonda havia de permetre fer un seguiment de la reacció amb la penicil·lina prou eficient per HPLC, i una posterior purificació dels adductes generats que calia incloure un grup cromòfor en l'estructura peptídica que absorbís a longituds d'ona majors que la penicil·lina (entre 400-500 nm)(R_1). Finalment la sonda també havia de contenir un connector, per a què en posteriors etapes es pogués unir a suports sòlids per realitzar els immunoassaigs de reconeixement de IgEs específiques (R_3). La sonda peptídica model és la que es mostra a la **Figura 2.11.**

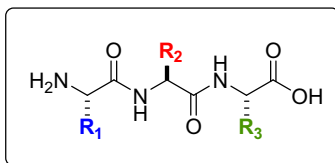


Figura 2.11. Tripèptid model on en cadascuna de les cadenes laterals s'inclou el cromòfor (R_1), el grup nucleòfil (R_2) i el connector (R_3).

2.2.2. Síntesi de les sondes peptídiques

Totes les sondes peptídiques que es descriuen a continuació es van sintetitzar en fase sòlida seguint l'estratègia Fmoc/^tBu. Es va utilitzar com a suport polimèric la reïna *NovaPEG Wang*. Aquesta és químicament inert a les condicions utilitzades durant la síntesi, estable mecànicament i completament insoluble en els dissolvents emprats. L'ús d'aquesta reïna va permetre obtenir els pèptids amb l'extrem C terminal en forma d'àcid carboxílic, fet que proporcionava polaritat a la sonda per poder utilitzar-la posteriorment en medis aquosos.

Per la incorporació del primer aminoàcid es requeria sintetitzar prèviament el seu anhidrid simètric. Això es va fer mitjançant la utilització d'una carbodiimida (DIC) per a l'activació de l'àcid carboxílic. Per l'ancoratge a la reïna es va utilitzar un catalitzador nucleòfil com el DMAP.

Pel que fa a l'elongació de la cadena peptídica, primerament era necessari fer l'activació del grup COOH de l'aminoàcid protegit, per tal de que aquest pogués reaccionar amb el grup NH₂ de l'AA unit a la reïna. Es va utilitzar com agent acoblant la sal de fosfoni HATU [178] i una base impedida com la DIEA per atrapar el protó de l'àcid carboxílic.

El desancoratge dels pèptids de la reïna es va dur a terme en condicions acidolítiques suaus. Es va utilitzar un 95% TFA amb l'ajuda de dos capturadors de carbocations: 2.5% de H₂O i 2.5% de TIS. Ambdós actuen com a donadors d'ions hidrur i bloquegen els carbocations dels grups protectors irreversiblement a través d'una reacció de transferència d'hidrur [197]. Es va escollir el TIS ja que és volàtil i es pot eliminar fàcilment per evaporació.

El primer pèptid que es va sintetitzar va ser el NBD-GKK(Biotin)G-OH (**4**) (**Figura 2.13**). Aquest pèptid contenia com a aminoàcid nucleòfil la lisina i el cromòfor utilitzat va ser el 7-nitrobenzofurazan, el qual es va unir a l'aminoàcid terminal en una etapa prèvia de síntesi en solució (**Figura 2.12**).

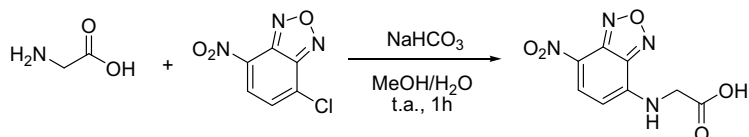


Figura 2.12. Síntesi en solució de l'AA Gly amb el cromòfor NBD (**1**).

Els motius principals d'escollir l'NBD com a cromòfor van ser la senzillesa estructural que presenta (facilita la caracterització per ressonància) i l'absència de grups funcionals que pugin reaccionar amb penicil·lines. A més, es un cromòfor molt accessible econòmicament. Inicialment es va pensar en l'ús del DNP com a cromòfor. El DNP presenta les mateixes avantatges que el NBD però absorbeix a una longitud d'ona de 350 nm, mentre que el NBD absorbeix a 477 nm. Ens vam trobar que fer el seguiment de la reacció a 350 nm era molt complex, ja que molts metabòlits provinents de l'amoxicil·lina també absorben a aquesta longitud d'ona confonent-se amb els adductes penicil·línics. Per aquest motiu es va decidir utilitzar un cromòfor que absorbís a longituds d'ona més altes.

Com a connector es va utilitzar la biotina, que té una gran afinitat per l'estreptavidina ($K_d = 10^{-14}$ M). El complex biotina-estreptavidina forma una de les unions amb enllaços no covalents més fortes que es coneixen en biologia. Com es pot deduir, aquesta va ser la unió que vam pensar per tal d'immobilitzar els possibles adductes al suport sòlid de l'immunoassaig.

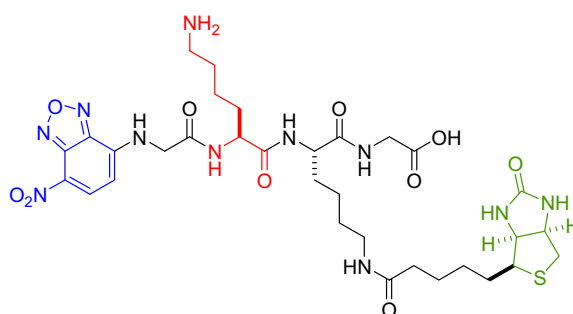


Figura 2.13. Sonda peptídica NBD-GKK(Biotin)G-OH (**4**).

El primer AA que es va ancorar a la reïna va ser la Gly. Es va escollir aquest perquè econòmicament era més assequible fer l'anhídrid simètric de la Gly que no pas de la Lys-Biotina.

La sonda peptídica **4** va presentar poca solubilitat en H₂O a causa de l'elevada presència de grups hidrofòbics (NBD i la biotina). Degut a que era important que la sonda fos soluble en medis aquosos, es va variar l'estructura de l'AA N-terminal, substituint el NBD-Gly per NBD-Asp. Conseqüentment es va preparar el pèptid NBD-DKK(Biotin)-G-OH (**5**) (**Figura 2.14.**).

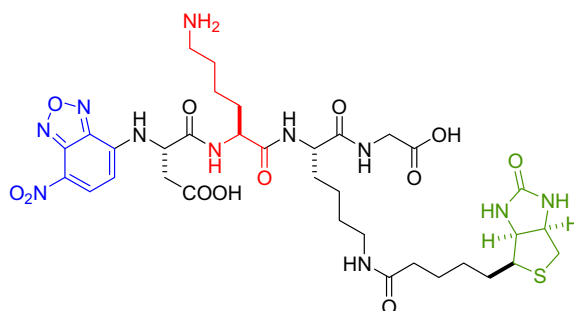


Figura 2.14. Sonda peptídica NBD-DKK(Biotin)G-OH (**5**).

Aquest pèptid, com l'anterior, es van obtenir amb rendiments al voltant de l'11% després d'una purificació cromatogràfica. Això ens va fer sospitar que possiblement en l'etapa de desprotecció del segon aminoàcid, l'amina lliure que es generava, situada a 6 posicions del carbonil del primer aminoàcid, pogués ciclar generant una DKP. D'aquesta manera es podia estar tallant la seqüència peptídica i provocant la baixada de rendiment que s'estava observant (**Figura 2.15.**).

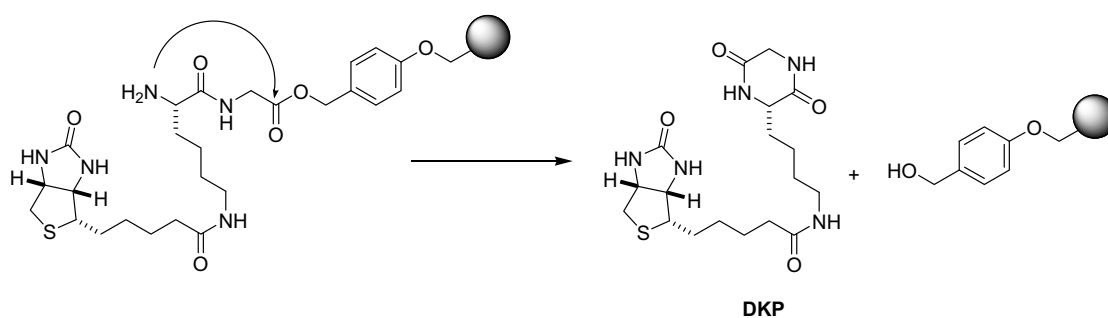


Figura 2.15. Formació de la DKP durant la desprotecció del segon aminòcid en la seqüència peptídica.

Així doncs, per evitar aquest possible problema es va optar per canviar la Gly de l'extrem C-terminal per la β -Ala, i evitar així la formació de la DKP. D'aquesta manera es va aconseguir augmentar rendiments fins valors de 15-19%. A més, un nou problema va aparèixer, en dissoldre aquesta sonda peptídica en solució aquosa bàsica el cromòfor s'hidrolitzava. Era important que la sonda fos el més estable possible a diversos pHs per poder

portar a terme el seguiment de la reacció per HPLC a longituds d'ona elevades[197] (**Figura 2.16.**)

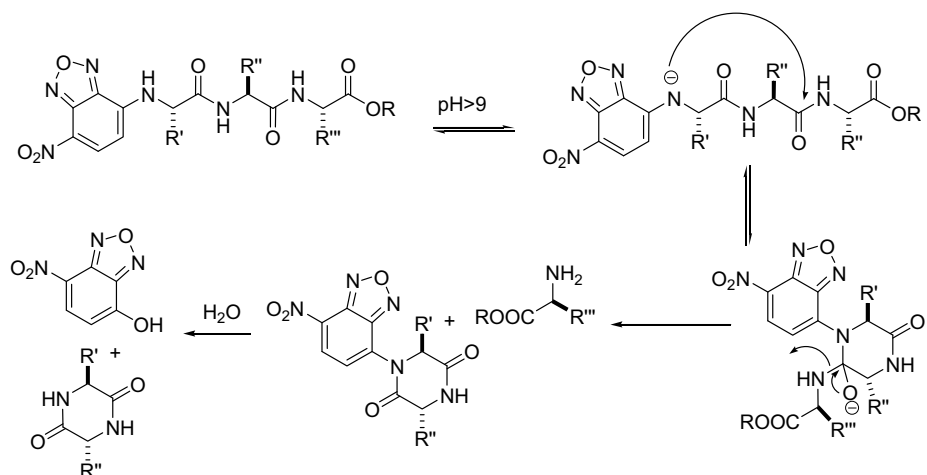
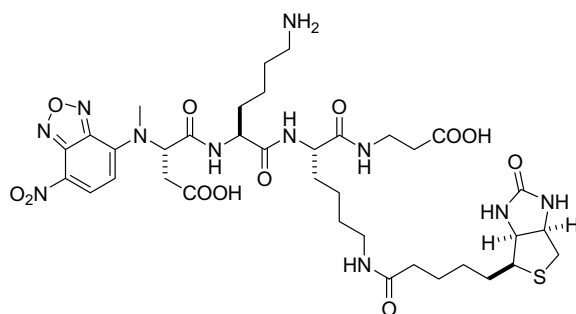


Figura 2.16. Hidròlisi del grup NBD en medis aquosos alcalins.

Per tal de solventar aquest segon problema es va decidir:

- Continuar treballant amb el mateix cromòfor (NBD) però unir-ho en aquest cas a l'AA Me-Asp per formar una amina terciària en lloc de la secundària i evitar d'aquesta manera la hidròlisi del cromòfor.
- Canviar de cromòfor i utilitzar el 5-FAM-COOH, el qual s'uneix directament a la Lys mitjançant un enllaç amida.

Finalment, els pèptids resultants van ser el NBD-D(Me)KK(Biotin) β -OH (**6**) i el FAM-KK(Biotin) β -OH (**7**) (**Figura 2.17.**), els quals es van sintetitzar, purificar per HPLC preparatiu i caracteritzar per RMN i MS.



6

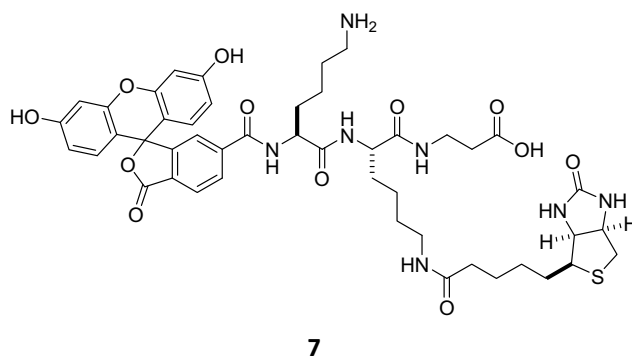


Figura 2.17. La sonda peptídica NBD-D(Me)KK(Biotin) β A-OH (**6**) i la sonda peptídica FAM-KK(Biotin) β A-OH (**7**)

L'aminoàcid N-terminal de la sonda **6** es va preparar en solució tal i com s'observa a la **Figura 2.18.** per obtenir el fragment NBD-Me-Asp(OtBu).

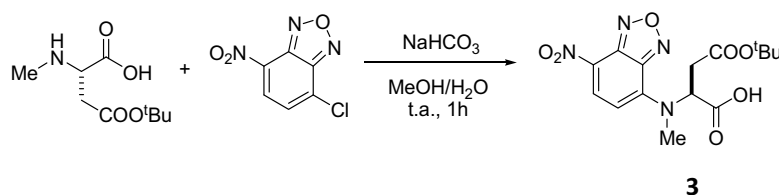


Figura 2.18. Síntesi en solució del bloc Me-Asp(OtBu) amb el cromòfor NBD.

El pèptid **6** continuava hidrolitzant-se en pHs bàsics però de manera més lenta que la sonda **5**. La metilació de l'amina secundària de l'àcid aspàrtic va resultar ser una bona estratègia per guanyar estabilitat en medis alcalins. Tot i que, el pèptid **7** va resultar ser un pèptid més robust, degut a l'elevat cost del cromòfor 5-FAM-COOH, no es va poder escalar la síntesi d'aquesta sonda. Per tant, la gran majoria d'assajos que es descriuran a continuació es van fer utilitzant la sonda peptídica **6**.

2.2.3. Producció de nous determinants antigènics derivats de l'amoxicil·lina

Després d'haver aconseguit obtenir 2 sondes peptídiques, solubles en solucions aquoses i estables a diferents pHs, es va procedir a l'obtenció dels adductes penicil·línics. Tenint en compte que l'amoxicil·lina és un dels antibiòtics penicil·línics més utilitzats a nivell mundial i que els determinants antigènics que pot generar no estan en molts casos caracteritzats, es va decidir utilitzar aquest antibiòtic com a centre d'aquest estudi.

2.2.3.1. Optimització de la reacció a escala analítica

Primerament es va fer un estudi dels equivalents necessaris d'amoxicil·lina que calia utilitzar respecte la sonda peptídica per poder generar de forma eficient el major nombre d'adductes pèptid-amoxicil·lina en condicions fisiològiques. Així l'experiment consistia en posar en contacte l'amoxicil·lina amb la sonda **6** en un medi de PBS 10 mM a pH 7, sota atmosfera de N₂, a 37 °C i durant 5 dies. L'única variable eren els equivalents d'amoxicil·lina. També es van fer els blancs corresponents, tant d'amoxicil·lina com de pèptid. En la **Taula 2.1.** es poden observar totes les combinacions que es van provar. Les reaccions es van seguir per HPLC, monitoritzant la longitud d'ona del detector a 470 nm.

Taula 2.1. Reacció d'optimització dels equivalents d'amoxicil·lina necessaris.		
Reacció	[Amoxicil·lina](mM)	[Sonda 6](mM)
R1	0.5	0.5
R2	0.5	0
R3	2.5	0.5
R4	2.5	0
R5	5	0.5
R6	5	0
R7	12.5	0.5
R8	12.5	0
R9	0	0.5
R10	0	0

Quan es treballava amb més de 10 equivalents d'amoxicil·lina (5 mM), el medi quedava saturat i l'amoxicil·lina quedava en suspensió. A més, a mesura que anaven passant els dies, l'amoxicil·lina degradava de manera exponencial. Es va considerar deixar les reaccions com a màxim 4 dies treballant a 5 mM d'antibiòtic. Aquest experiment va permetre observar l'aparició d'alguns pics molt minoritaris que només apareixien quan hi havia presència tant de l'amoxicil·lina com de sonda, mentre que no apareixien en els blancs. Amb aquests indicis, es van escalar les reaccions, treballant a diferents pHs i utilitzant les dos sondes sintetitzades (sondes **6** i **7**).

2.2.3.2. Obtenció i separació dels adductes amoxicil·línics.

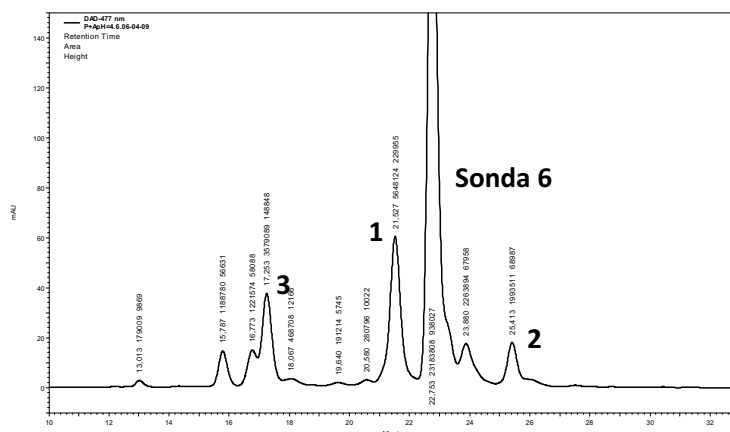
Utilitzant les concentracions d'amoxicil·lina i de pèptid establertes es va decidir treballar a 3 pHs diferents per establir la influència d'aquest factor en la generació de determinants antigènics. La raó de treballar a diferents pHs és que, tot i que el pH fisiològic d'un mamífer és al voltant de 7.5, en les cavitats de les proteïnes endògenes haver-hi valors puntuals de pH més àcids o més alcalins dels valors habituals. Això es degut als grups funcionals que formen els aminoàcids de les proteïnes. És lògic pensar que si hi ha Asp o Glu és pugui crear un entorn més àcid que si hi ha Lys o Cys. Per aquest motiu quan una molècula d'amoxicil·lina s'aproxima a una proteïna es possible que reaccioni amb ella de diferent manera en funció del pH concret que es trobi.

Les reaccions es van fer utilitzant medis el més semblant a les condicions fisiològiques. Per això es van preparar tampons fosfat 10 mM amb un 0.8 % de solució salina a pH 4.6, 7 i 11. Com les sals de fosfat no tamponen a pH 11, es va utilitzar paral·lelament un tampó de carbonat a pH 11 per tal de comparar resultats i veure si veritablement es podia formar el mateix adducte en els dos tampons alcalins diferents. Utilitzant les concentracions de pèptid i amoxicil·lina descrites anteriorment es va escalar la reacció 10. Sumant els blancs i les diverses condicions d'assaig, es van preparar 15 combinacions diferents entre l'amoxicil·lina i les sondes. En tots els casos es va treballar sota atmosfera d'Argó i es van incubar les reaccions a 37 °C amb agitació constant. Totes les combinacions que es van portar a terme es descriuen a la **Taula 2.2.**:

Taula 2.2. Reaccions realitzades en la preparació dels adductes d'amoxicil·lina.			
Reacció	Peptid	[Amoxicil·lina](mM)	pH
R1	6	5	4.6
R2	6	0	4.6
R3	6	5	7
R4	6	0	7
R5	6	5	11 (PBS)
R6	6	0	11 (PBS)
R7	6	5	11 (carbonat)
R8	6	0	11 (carbonat)
R9	7	5	4.6
R10	7	0	4.6
R11	7	5	7
R13	7	0	7
R14	7	5	11 (PBS)
R15	7	0	11 (PBS)

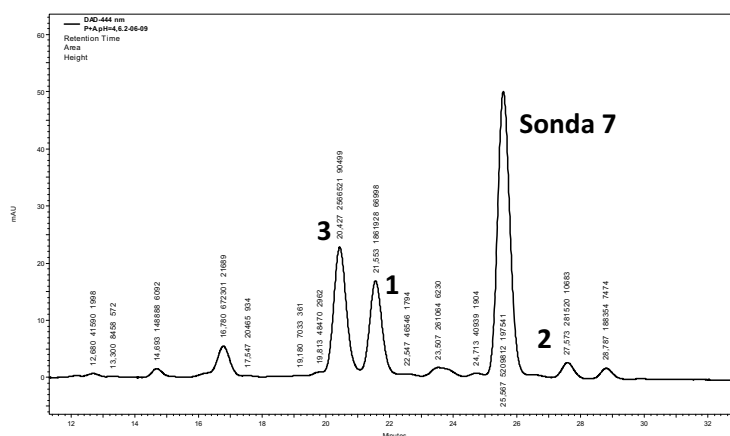
Els resultats obtinguts van confirmar els indicis observats anteriorment. En treballar a pH 4.6 es van obtenir 2 pics que no apareixien en els blancs, tant utilitzant el pèptid **6** com el pèptid **7**. Aquests dos pics es van separar per HPLC en fase reversa. La reacció es va monitoritzar a $\lambda = 479$ nm. Per tal de fer una primera caracterització dels adductes aïllats, aquests es van analitzar per UPLC-MS. La massa obtinguda va correspondre a la suma de la massa de l'amoxicil·lina més la massa de la sonda peptídica en qüestió. També va aparèixer un altre pic, caracteritzat per masses, corresponent a la oxidació dels adductes **6** i **7** (**Figura 2.20**). Creiem que aquesta oxidació es produïa sobre l'àtom de sofre de la biotina.

Obtenció dels adductes amoxicil·línics a pH 4.6 utilitzant la sonda peptídica 6



Pic 1: Adducte NKAx1, Pic 2: Adducte NKAx2 i Pic 3: Oxidació del pèptid 6.

Obtenció dels adductes amoxicil·línics a pH 4.6 utilitzant la sonda peptídica 7

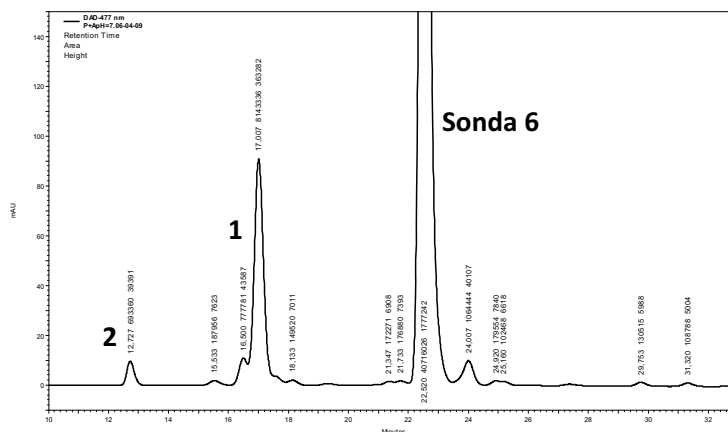


Pic 1: Adducte FKAx1, Pic 2: Adducte FKAx2 i Pic 3: Oxidació del pèptid 7.

Figura 2.19. Reaccions a pH 4.6 utilitzant les sondes 6 i 7 en presència d'amoxicil·lina.

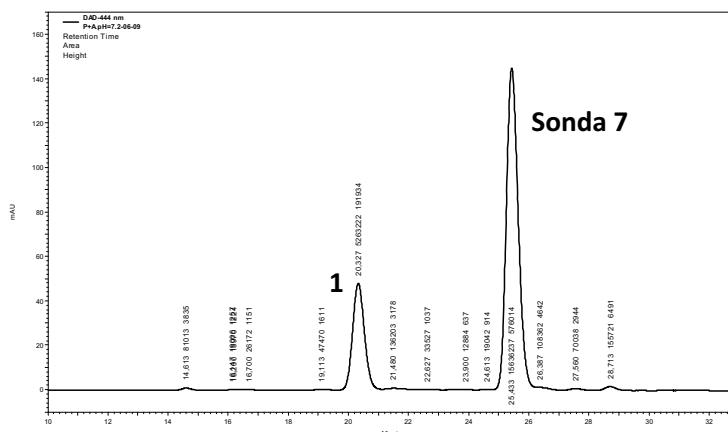
En el cas de treballar a pH 7 no es va aconseguir aïllar cap adducte sonda-amoxicil·lina. Els principals pics que es van generar a aquest pH van ser el pic d'oxidació del pèptid i, en el cas d'utilitzar la sonda 6, el pic d'hidròlisi del cromòfor NBD. En la Figura 2.20. s'observen els cromatogrames obtinguts.

Obtenció dels adductes amoxicil·línics a pH 7 utilitzant la sonda peptídica 6



Pic 1: Oxidació del pèptid 6 i Pic 2: Hidròlisi del cromòfor NBD.

Obtenció dels adductes amoxicil·línics a pH 7 utilitzant la sonda peptídica 7

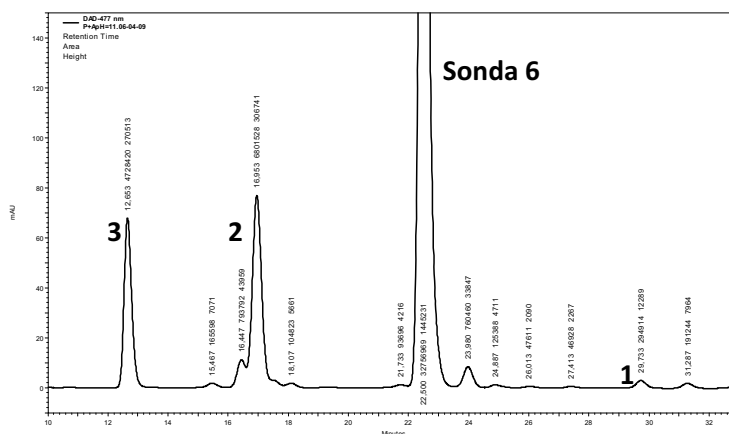


Pic 1: Oxidació del pèptid 7.

Figura 2.20. Reaccions a pH 7 utilitzant les sondes 6 i 7 en presència d'amoxicil·lina.

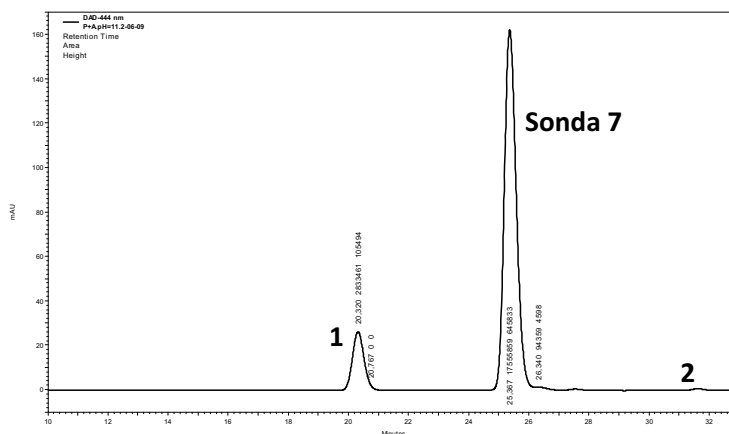
En reproduir la reacció a pH 11, tant utilitzant tampó fosfat com tampó carbonat, mitjançant ambdues sondes es va aconseguir aïllar un altre adducte diferent dels dos obtinguts a pH 4,6. Aquest nou adducte va ser separat per HPLC i caracteritzat per UPLC-MS. Novament va aparèixer pic d'oxidació dels pèptids, i en el cas de la sonda 6 pic d'hidròlisi del cromòfor NBD (Figura 2.21).

Obtenció de l'adducte amoxicil·línic a pH 11 utilitzant la sonda peptídica 6



Pic 1: Adducte NKAx3, Pic 2: Oxidació del pèptid 6 i Pic 3: Hidròlisi del cromòfor NBD.

Obtenció de l'adducte amoxicil·línic a pH 11 utilitzant la sonda peptídica 7



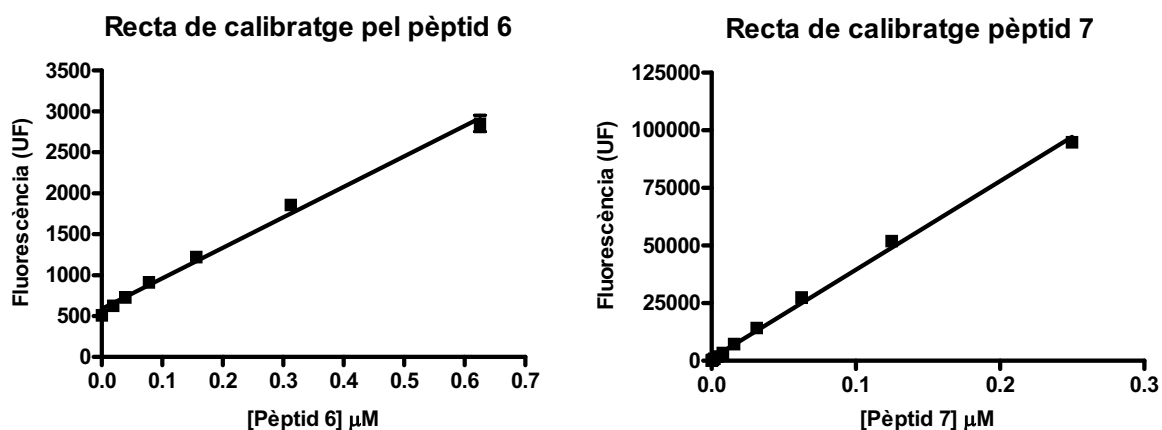
Pic 1: Adducte FKAx3, Pic 2: Oxidació del pèptid 7.

Figura 2.21. Reaccions a pH 11 utilitzant les sondes 6 i 7 en presència d'amoxicil·lina.

En resum, es van poder identificar, separar per HPLC preparatiu i caracteritzar per UPLC-MS (veure **Annex 2**) 3 adductes per cadascuna de les sondes peptídiques (veure **Taula 2.3.**).

Taula 2.4. Resum dels adductes obtinguts amb cadascuna de les sondes peptídiques utilitzades.		
Nom de l'adducte	pH obtingut	Pèptid utilitzat
NKAx1	4,6	6
NKAx2	4,6	6
NKAx3	11	6
FKAx1	4,6	7
FKAx2	4,6	7
FKAx3	11	7

Aquests adductes van ser posteriorment liofilitzats, redissolts en un volum conegut d'aigua i finalment aliquotats. Per conèixer la concentració en que es trobava cada adducte es va fer una recta de calibratge amb concentracions conegudes de les corresponents sondes peptídiques. Les concentracions dels diferents adductes es varen calcular interpolant els seus valors de fluorescència a la recta de calibratge (Figura 2.22.).



$\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$, cutt off = 530 nm

$\lambda_{ex} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$, cutt off = 515 nm

Figura 2.22. Rectes de calibratge de les dues sondes peptídiques.

2.2.3.3. Elucidació estructural dels adductes amoxicil·línics

Una de les grans finalitats d'utilitzar sondes peptídiques per a captar fàrmacs, és poder identificar exactament l'estructura de l'epítot responsable de la reacció al·lèrgica. Fins el moment, el diagnòstic *in vitro* de fàrmacs β -lactàmics es basa principalment en buscar una

resposta positiva a l'antigen de Peniciloil-Polilisina (PPL), on l'epítot correspon a l'obertura de l'anell β -lactàmic mitjançant els grups amino de la polilisina.

La síntesi del determinant antigènic PPL es descriu a la literatura en repetides ocasions [196, 198, 199]. Principalment consisteix en fer la reacció en medis aquosos alcalins (NaOH o sals de carbonat) i deixar que les amines de la polilisina obrin l'anell β -lactàmic. Es així com es va generar l'adducte 3 (NKAx3 i FKAx3) ja que la reacció tenia lloc en condicions alcalines (pH 11). Per tant, l'estructura dels adductes preparats a aquest pH era la descrita com a determinant majoritari (**Figura 2.23.**).

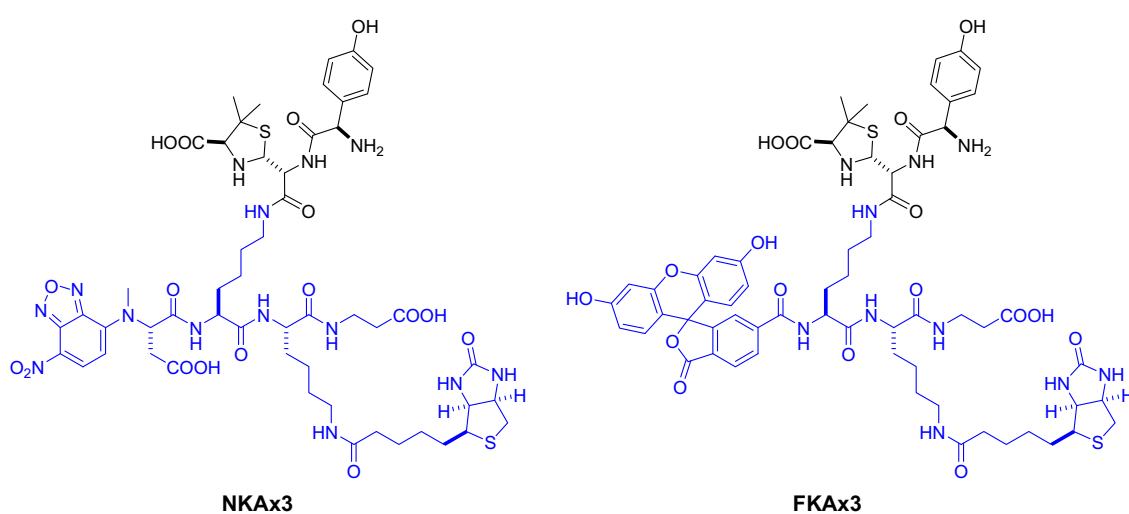


Figura 2.23. Estructura dels adductes amoxicil·línics NKAx3 i FKAx3.

En el cas dels adductes obtinguts a pHs lleugerament àcids no es va trobar cap referència a la literatura. Per tant, per poder fer una bona caracterització dels dos adductes obtinguts, i així esbrinar quin era el punt d'unió entre la sonda i l'amoxicil·lina, es van dissenyar una sèrie de pèptids amb els mateixos grups funcionals que la sonda **6** però simplificant l'estructura notablement. Cal esmentar que aquesta darrera part de síntesi i caracterització es va fer en col·laboració amb la Marta Broto, estudiant de màster de la UB. Es van preparar tres pèptids. El primer d'ells contenia el grup cromòfor NBD i la lisina (NBD-D(Me)K β A-OH). El segon pèptid contenia el grup NBD però sense lisina (NBD-D(Me) β A-OH), i el tercer estava preparat amb el cromòfor DNP-Gly i la lisina (DNP-GK β A-OH)(Figura **2.24.**).

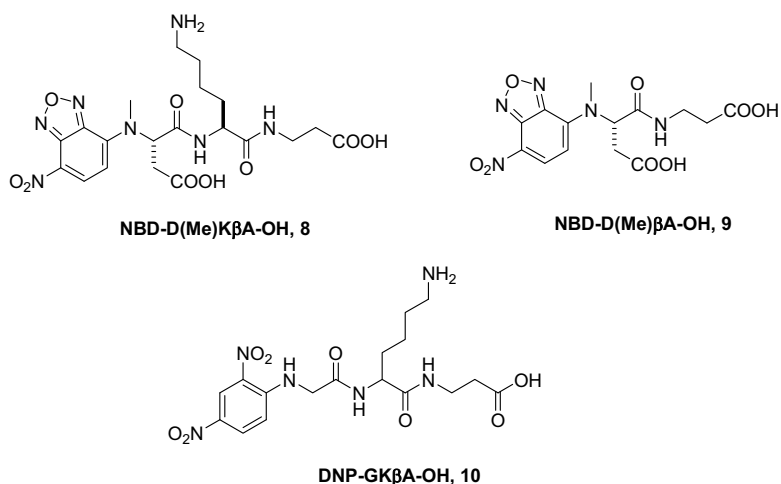


Figura 2.24. Esquema de les tres sondes peptídiques dissenyades per fer l'estudi de reactivitat amb l'amoxicil·lina.

La síntesis de tots tres pèptids es va dur a terme en SPPS de la mateixa manera que amb les sondes **6** i **7**. Cal destacar que, mentre que els pèptids **8** i **9** tenien dos grups àcid en la seva estructura, el pèptid **10** només en conservava un.

El pèptid NDB-D(Me)KβA-OH contenia els mateixos centres reactius que la sonda peptídica **6** però sense l'aminoàcid Lys-Biotina. La raó d'aquest pèptid era comprovar que no hi havia reactivitat a través de la biotina. Un cop sintetitzat, mitjançant l'HPLC es va poder observar que apareixien dos pics majoritaris, tots dos amb el mateix perfil d'absorbància. Per tal d'esbrinar a que corresponien, es van separar per HPLC preparatiu i es van caracteritzar per UPLC-MS i RMN. Tots dos coincidien tant en la massa exacte com en l'espectre de RMN.

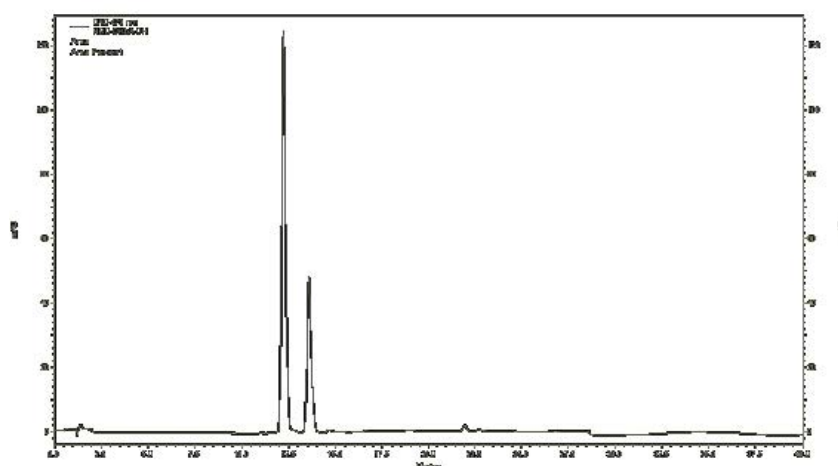


Figura 2.25. Cromatografia del cru de síntesi de NBD-D(Me)KβA-OH.

Per tal de comprovar que veritablement es tractava de dos estereoisòmers, segurament degut a les dues configuracions possibles del grup amino terciari es va fer una prova on es separaven cadascun dels pics i s'escalfaven gradualment a diferents temperatures. Cap als 80 °C es va observar que hi havia la interconversió dels dos pics. Aquest experiment s'il·lustra a la Figura 2.26.

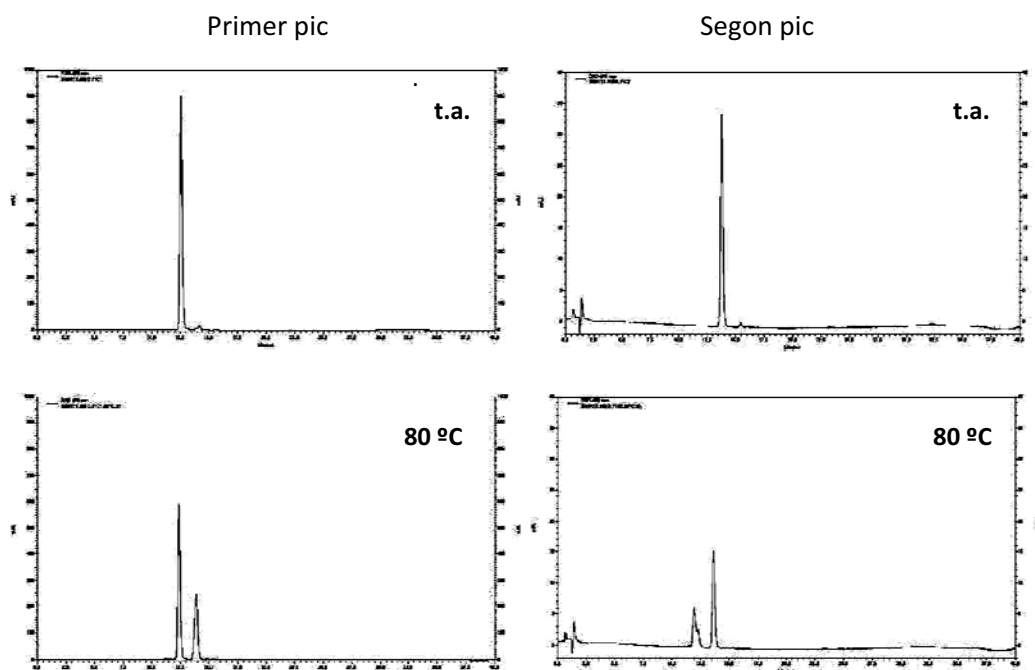


Figura 2.26. Interconversió dels dos estereoisòmers del pèptid NBD-D(Me)KβA-OH amb la temperatura.

El pèptid NBD-D(Me) β A-OH es va sintetitzar per tal de discernir, en una etapa posterior, si la lisina té un paper clau en la formació de l'adducte.

El pèptid DNP-GKbA-OH es va sintetitzar canviant el grup cromòfor per tal de confirmar si era aquest el responsable o no de la unió amb l'amoxicil·lina. Un cop els nous pèptids van ser caracteritzats, aquests es van fer reaccionar amb l'amoxicil·lina a pH 4,6 en tampó fosfat a una concentració de 0.1 M de pèptid i 1 M d'amoxicil·lina. La reacció es va deixar a 37 °C durant 5 dies. El seguiment de la reacció per UPLC-MS va permetre reconèixer els pics que tenien la massa de l'adducte esperat. A la **Figura 2.27**, s'observen els cromatogrames obtinguts de la reacció entre els diversos pèptids i l'amoxicil·lina.

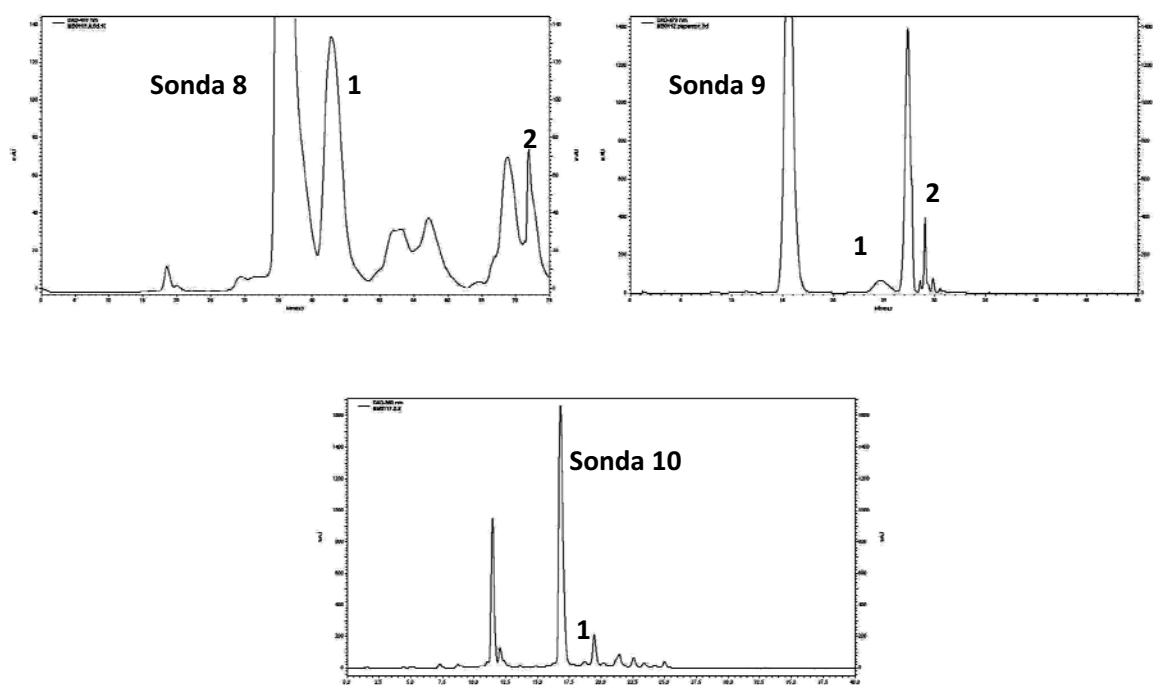


Figura 2.27. Obtenció dels adductes amoxicil·línics a pH 4.6 utilitzant les sondes peptídiques **8**, **9** i **10**. Els pics 1 i 2 corresponen al número d'adductes trobats per UPLC-MS utilitzant cadascuna de les tres sondes.

En resum, es van poder identificar, separar per HPLC preparatiu i caracteritzar per UPLC-MS cinc adductes a partir dels pèptids **8**, **9** i **10**, dos dels quals també van ser caracteritzats per RMN.

Arribats a aquest punt tots els indicis apunten a que no és el grup amino de la Lys el que reacciona amb l'amoxicil·lina a pH 4.6 per generar els adductes, sinó molt probablement són els àcids carboxílics els causants de la formació dels adductes. Com es pot observar, en les tres proves descrites, anteriorment el nombre de grups carboxílics en cada pèptid correspon exactament amb el nombre d'adductes formats, independentment del cromòfor emprat. Per

tant, es pot assumir que el cromòfor no interfereix en la reacció. Per tal d'arrodonir aquestes qüestions es van caracteritzar les estructures dels adductes formats amb el pèptid **8**. Aquests adductes es van purificar per HPLC preparatiu i es van caracteritzar per RMN mitjançant espectres mono- i bidimensionals (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, H2BC i NOESY).

Els espectres de ressonància magnètica mostren que els carbonis que tenen un desplaçament més important corresponen als dels àcids carboxílics del pèptid. En el cas del primer adducte (pic 1) la variació s'observa en els carbonis de l'àcid carboxílic de l'aspàrtic i els del cromòfor, mentre que en el cas del segon adducte (pic 2) varien els carbonis de l'extrem C-terminal del pèptid **8**. Per altra banda, també es veu una variació en el desplaçament dels carbonis de l'anell β -lactàmic. Això fa pensar que la unió es produeix per l'anell tiazolidínic, a través d'una reacció de transamidació en medi àcid entre els grups carboxílics del pèptid i la amida de l'anell β -lactàmic, produint-se com a resultat l'obertura de l'anell β -lactàmic. En la **Figura 2.29**, es poden observar les estructures dels adductes aïllats, així com els carbonis que presenten un desplaçament més important tant en el pèptid com en l'amoxicil·lina abans i després de formar-se l'adducte. En la RMN dels dos adductes es pot observar la duplictat de senyals en l'espectre. Això és degut segurament als dos estereoisòmers que s'obtenen en la formació del nou enllaç amida. Aquest enllaç es forma entre el nitrogen de l'anell β -lactàmic i l'àcid del pèptid, i segurament està suficientment impedit per a que no hi hagi un intercanvi entre les dues configuracions (**Figura 2.28**).

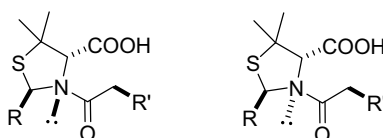


Figura 2.28. Estereoisòmers que apareixen de la formació dels adductes entre el pèptid **8** i l'amoxicil·lina.

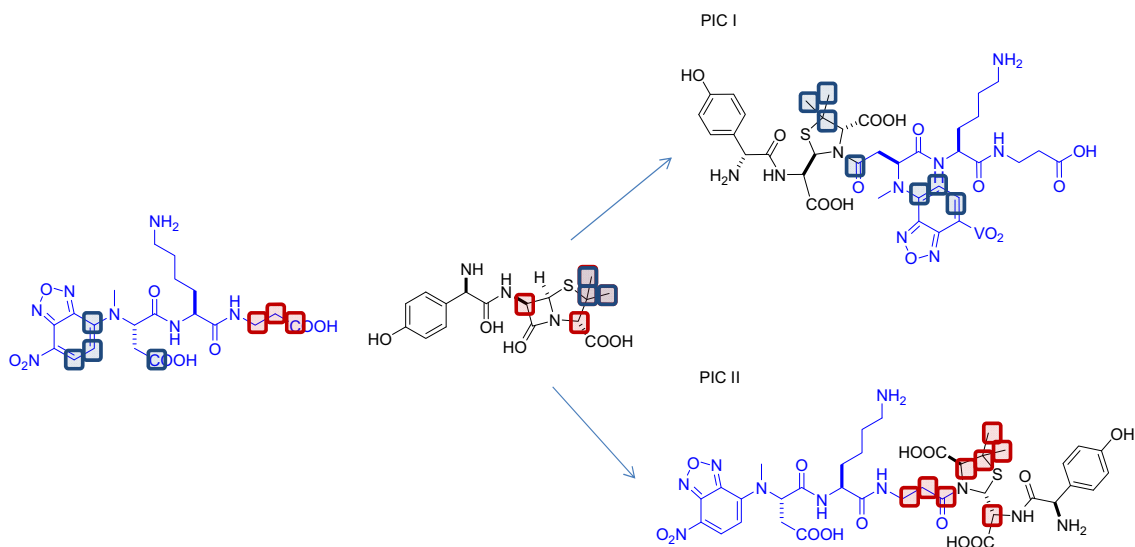


Figura 2.29. Estructures més probables dels dos adductes obtinguts de la reacció entre l'amoxicil·lina i el pèptid **8**. Amb un quadre blau s'han marcat els carbonis que més es desplacen en la formació de l'adducte 1, mentre que en vermell els que més es desplacen en la formació de l'adducte 2.

A través d'aquest estudi s'han pogut caracteritzar els adductes NKAx1, NKAx2, FKAx1 i FKAx2, els quals corresponen a dues noves espècies derivades de la interacció entre l'amoxicil·lina i un pèptid (una proteïna endògena en el cas d'un organisme). Fins el moment no s'havien identificat mai. Aquest descobriment pot ajudar a tenir un coneixement més ampli sobre els mecanismes involucrats en les reaccions d'hipersensibilitat (o al·lèrgia) a les penicil·lines. A la **Figura 2.30**, s'observa la relació entre els adductes obtinguts utilitzant el pèptid **8** amb els adductes NKAx1 i NKAx2 obtinguts amb el pèptid **6**.

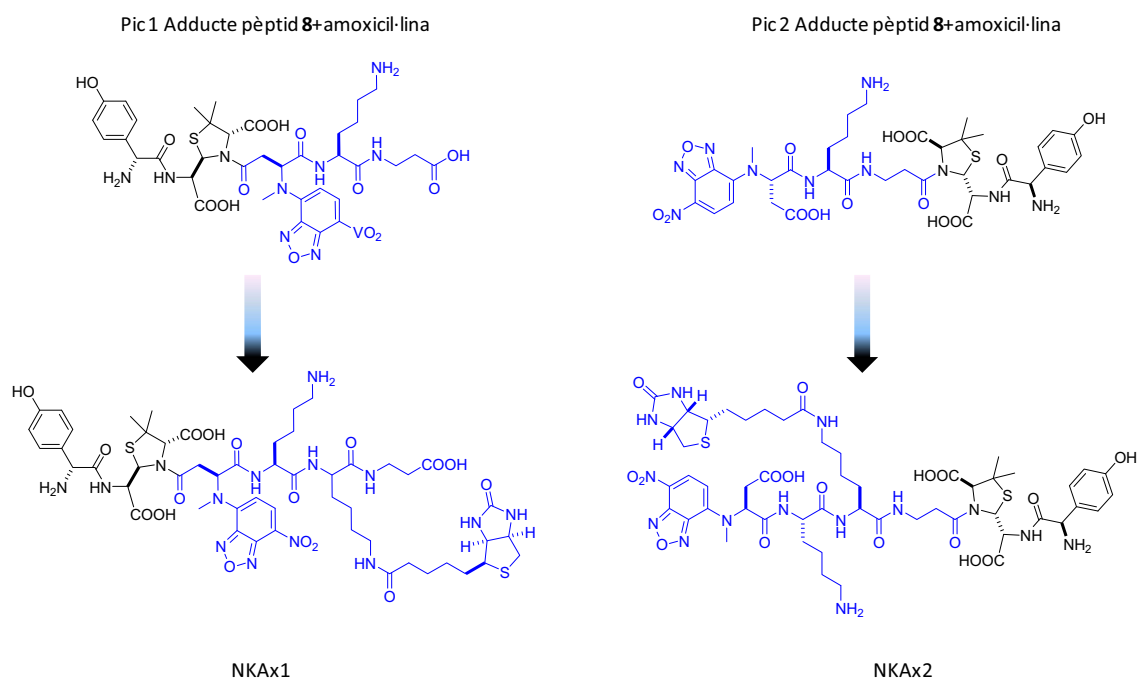


Figura 2.30. Elucidació estructural dels adductes NKAx1 i NKAx2 a partir dels seus anàlegs simplificats obtinguts amb el pèptid **8**.

2.3. Resum i conclusions del capítol

Molt resumidament, els passos que s'han descrit en aquest capítol han estat:

- La síntesi i caracterització de dues sondes peptídiques amb diverses propietats químiques.
- Els estudis de reactivitat entre les dues sondes i l'amoxicil·lina a diferents pHs.
- L'obtenció de tres adductes, dos d'ells mai descrits anteriorment a diferents pHs.

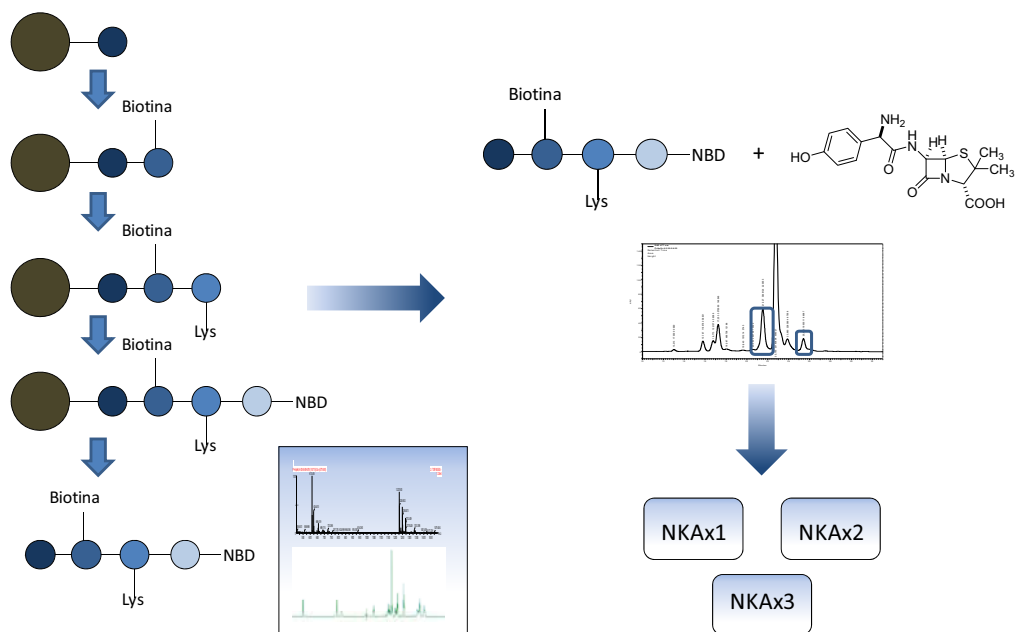


Figura 2.31. Resum esquemàtic del contingut d'aquest capítol.

3. Disseny i síntesi d'antígens penicil·línics

En aquests capítol es descriu el disseny de tots els immunògens i antígens que s'han preparat durant aquest treball. S'han preparat tres immunògens, tots ells derivats de l'amoxicil·lina, els quals s'han utilitzat per produir els anticossos mono i policlonals. Els antígens, produïts a partir de quatre penicil·lines diferents, s'han utilitzat pel desenvolupament d'immunoassaigs per la detecció de penicil·lines en mostres de llet (**Capítol 4**) i pel desenvolupament d'assaigs per la detecció d'IgEs específiques a fàrmacs β -lactàmics (**Capítol 5**).

3.1. Disseny dels immunògens

El primer pas i més important per a la producció d'anticossos és el disseny de l'immunogen. El disseny determinarà l'especificitat i la sensibilitat dels anticossos produïts.

3.1.1. L'immunogen

L'immunogen és la substància química, que un cop introduït a un organisme, activarà un procés immunològic amb la conseqüent producció d'anticossos. Normalment les molècules amb un pes molecular alt (> 5000 Da) estimules per si mateixes aquest procés immune. Però això no és així en molècules de baix pes molecular. En aquest cas, si es volen obtenir anticossos contra aquests, primerament s'han de conjuguar a una proteïna transportadora immunogènica. Per aquest motiu, si es volen produir anticossos, aquesta molècula o analit ha de ser modificat químicament amb un braç espaiador, consistent generalment en una cadena carbonatada amb un grup funcional a l'extrem, el qual podrà unir-se a la proteïna immunogènica. Hi ha altres opcions per obtenir aquests immunògens, com per exemple l'ús d'agents entrecreudadors (**Figura 3.1.**).

Del conjunt d'anticossos generats contra un immunogen s'anomena sèrum policlonal (PAb). Cadascun d'aquests anticossos reconeix una regió concreta de l'immunogen, aquestes regions es coneixen com determinants antigènics.

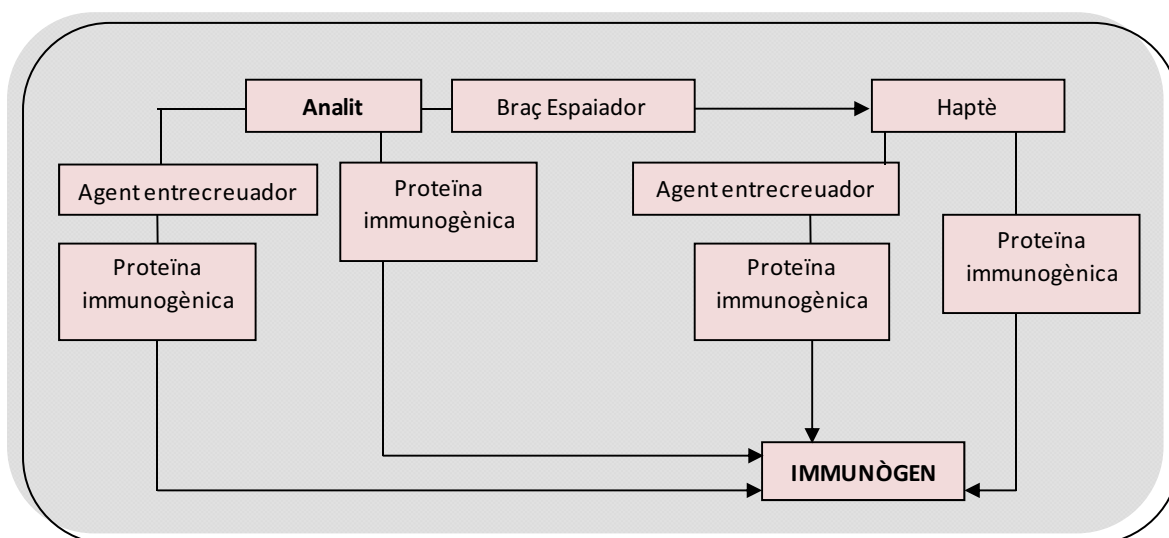


Figura 3.1. Esquema on s'il·lustren les diverses vies per la generació d'un immunogen.

3.2. Disseny dels haptens penicil·línics

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'haptè és bàsicament una molècula molt semblant a l'analit però modificada d'una manera que permeti la seva unió a la proteïna. Aquestes modificacions han de permetre mantenir intactes les zones més característiques de la molècula, així com conservar les seves propietats fisico-químiques. En molts casos aquesta modificació implica introduir una cadena carbonada amb un grup funcional al final (-COOH, -OH, -SH, -NH₂). La raó d'introduir aquest braç espaiador és per distanciar l'analit dels efectes estèrics de la proteïna i així deixar exposat al màxim l'estructura de la molècula al sistema immune [200].

Ahora de dissenyar un haptè, inicialment s'ha d'estudiar bé l'estructura de l'analit i decidir quins epítops o determinants antigènics són els més interessants per ser reconeguts pels anticossos. S'ha demostrat moltes vegades que, quan més grups funcionals té l'estructura que es vol reconèixer, més bons són els anticossos que es generen contra ella. En el cas de les penicil·lines, cal emfatitzar la gran funcionalització que presenten aquestes (**Figura 3.2.**). Es tracta de molècules de poc pes molecular però amb presència de molts grups reactius, com l'àcid carboxílic, la pròpia β-lactama o l'anell tiazolidínic. En el cas de les aminopenicil·lines aquestes tenen un grup amino molt important en la seva cadena lateral. També són bastant

immunogènics els grups fenils i els fenols, presents també en la cadena lateral de les penicil·lines.

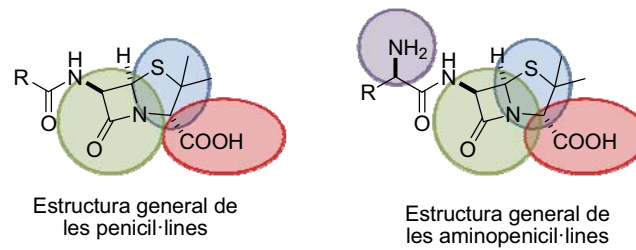


Figura 3.2. Elevada funcionalització dels fàrmacs penicil·línics.

Alhora de dissenyar un immunogen també s'ha de tenir present si els anticossos resultants han de ser específics, que reconeixin exclusivament un sol analit (ex. amoxicil·lina), o de família, que reconeixin tot el grup de compostos químicament semblants (ex. penicil·lines). En aquest estudi es varen dissenyar 4 tipus d'haptens. Cadascun d'ells pretenia exposar o bé la part constant o bé la part variable de les penicil·lines utilitzant diferents tipus de braços espaiadors. La **Figura 3.3.** mostra els diversos haptens que s'han dissenyat per obtenir anticossos específics a penicil·lines.

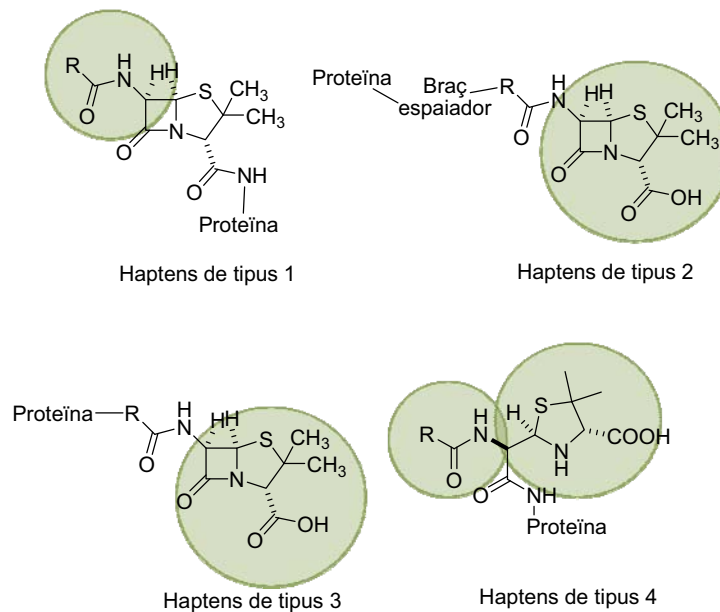


Figura 3.3. Representació dels 4 haptens dissenyats. L'àrea colorejada indica l'epítop que en principi queda exposat al sistema immune.

3.3. Síntesi dels haptens penicil·línics

3.3.1. Síntesi dels haptens de tipus 1

Els haptens de tipus 1 estan especialment dissenyats per la detecció de les cadenes laterals de les penicil·lines. Bàsicament es basen en aprofitar el grup àcid comú en totes les penicil·lines i unir-ho mitjançant un enllaç peptídic a les lisines de la proteïna. Pel cas de les aminopenicil·lines (amoxicil·lina i ampicil·lina), prèviament es va haver de bloquejar el grup amino d'aquestes mitjançant el grup protector teoc 1-[2-(trimetilsilil)etoxicarboniloxi]- (teoc) (veure **Figura 3.4.**). Una de les avantatges que ofería aquest grup protector era les condicions suaus de desprotecció.

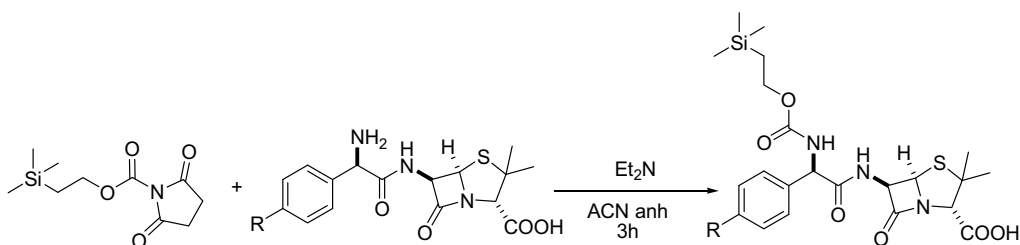


Figura 3.4. Protecció del grup amino de les aminopenicil·lines mitjançant el grup teoc a través de la formació d'un carbamat.

3.3.2. Síntesi dels haptens de tipus 2

Aquests haptens estan dissenyats per exposar al sistema immunitari el grup β -lactàmic comú en totes les penicil·lines, i així obtenir anticossos de família. Per aquesta raó es va pensar en la incorporació d'un braç espaiador a través del grup amino d'una aminopenicil·lina. En aquest cas però, es va decidir introduir un tiol com a grup funcional reactiu per poder unir l'haptè a la proteïna. L'estratègia que es va utilitzar va ser desenvolupada pel nostre grup ja fa uns anys [201]. Aquesta consisteix en la síntesi d'un dímer de la penicil·lina mitjançant un pont disulfur. La reducció d'aquest grup en condicions aquoses suaus genera un tiol lliure que fàcilment es pot unir a la proteïna. Més concretament, es van generar uns dímers provinents de l'amoxicil·lina i l'ampicil·lina que posteriorment van ser reduïts amb la resina DBPP per obtenir els corresponents haptens. El primer pas, va ser sintetitzar el braç espaiador, generant els esters de succinimida de l'àcid comercial 4,4'-ditiodibutíric.

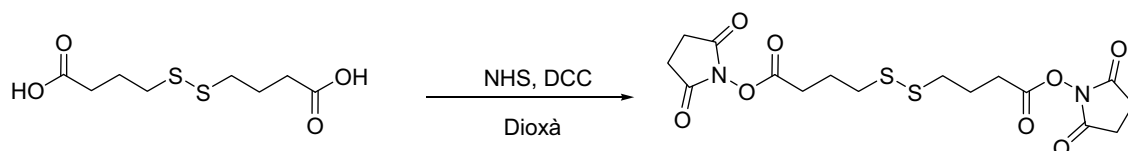


Figura 3.5. Síntesi del braç espaiador de grup 2.

A continuació es va realitzar la unió d'aquest tant amb la amoxicil·lina com amb l'ampicil·lina. El rendiment global de la reacció va ser 53-63% (**Figura 3.6.**).

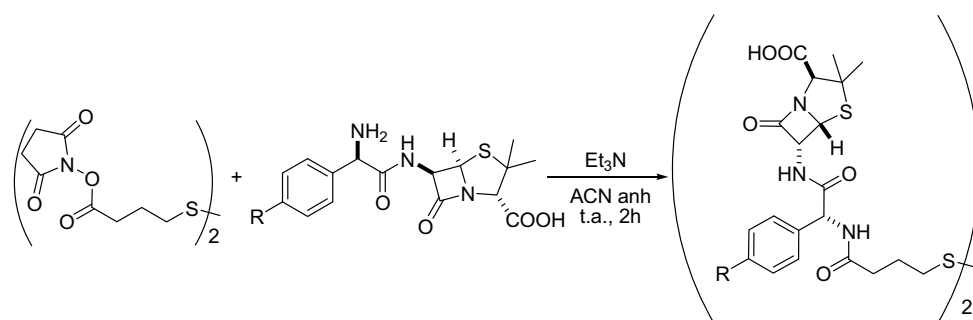


Figura 3.6. Síntesi dels dímers penicil·línics. On R = H correspon al dímer provinent de l'ampicil·lina i R = OH correspon al dímer provinent de l'amoxicil·lina.

Aquests dos dímers es van conservar fins al mateix moment d'unió amb la proteïna, on es va realitzar una reducció *in situ*, per tal d'alliberar el grup tiol i unir el corresponent monòmer a la proteïna.

3.3.3. Síntesi dels haptens de tipus 3 i 4.

Els haptens de tipus 3 estan també dissenyats per exposar l'anell β -lactàmic. En aquest cas, la unió entre l'haptè i la proteïna va ser directa, sense cap braç espaiador. Només s'utilitzaren agents entrecruadors bifuncionals. Es van fer servir les aminopenicil·lines per aprofitar els seu grup amino i així unir-lo a la proteïna.

Els haptens de tipus 4 es van preparar unint directament les proteïnes a les penicil·lines en medis alcalins. D'aquesta manera es va maximitzar la unió de la proteïna mitjançant la obertura de l'anell β -lactàmic.

En la **Figura 3.7.** s'il·lustren tots els haptens generats en aquest treball. La combinació d'aquests amb els diferents agents entrecruadors i proteïnes transportadores van generar una ampla bateria d'antígens emprats en els posteriors estudis.

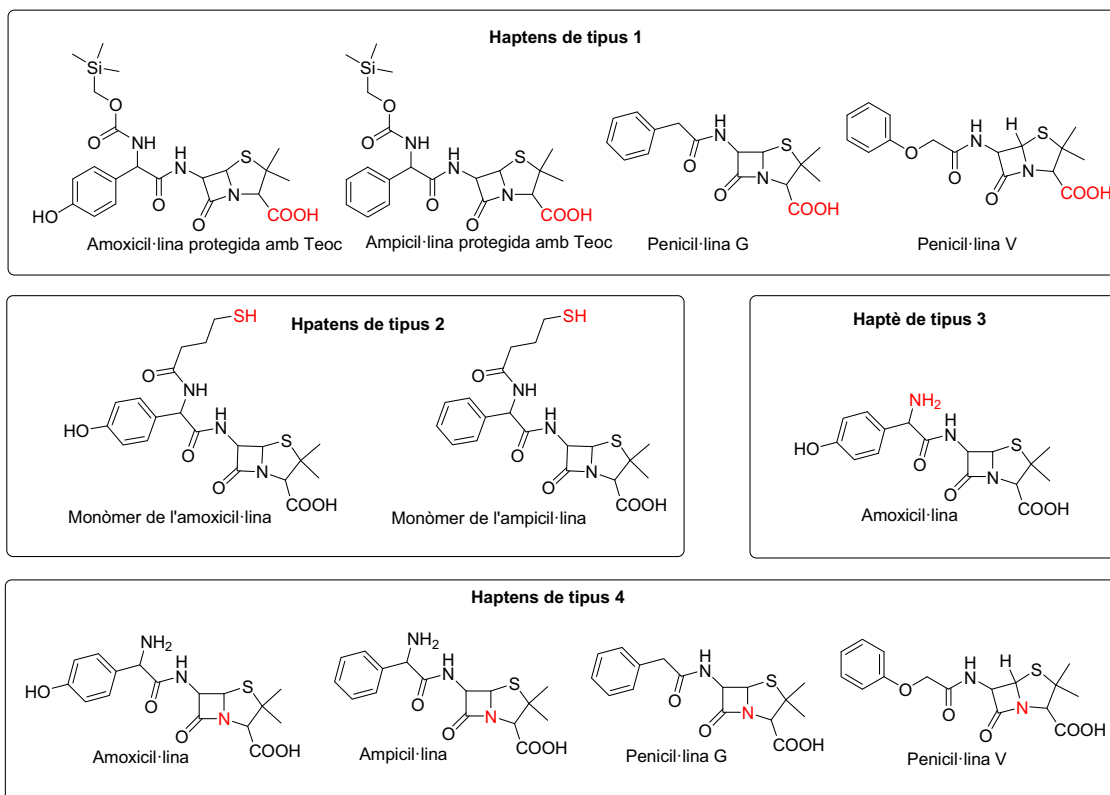


Figura 3.7. Estructura dels haptens. Les zones en vermell són els grups funcionals emprats en la conjugació a les proteïnes.

3.4. Agents entrecruadors bifuncionals

Els agents entrecruadors s'utilitzen en immunoquímica per unir els haptens a les proteïnes. En aquest treball es van utilitzar 3 entrecruadors heterobifuncionals, és a dir, que diversos grups funcionals poden unir-se a ells ortogonalment. L'estratègia en l'ús dels agents entrecruadors és diversa, ja que es poden unir primer a la proteïna i després a l'haptè, o a l'inrevés.

Els agents entrecruadors utilitzats estan representats a la **Figura 3.8.**

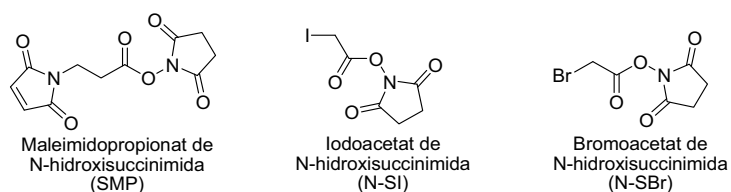


Figura 3.8. Agent entrecruadors immunoquímics.

Els tres agents entrecruadors van ser sintetitzats prèviament. Tant el N-SBr com el N-SI es van sintetitzar a partir dels corresponents àcids i generant els seus esters de N-hidroxisuccinimida [202], tal i com es descriu a la **Figura 3.9**.

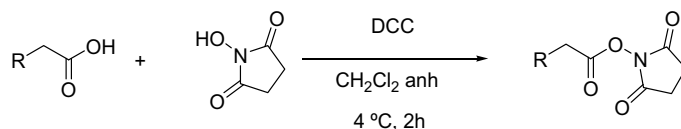


Figura 3.9. Síntesi dels agents entrecruadors de tipus N-SBr i N-SI.

D'altra banda, la síntesi de l'agent entrecruador SMP es va realitzar seguint el protocol descrit per Nielsen [203]:

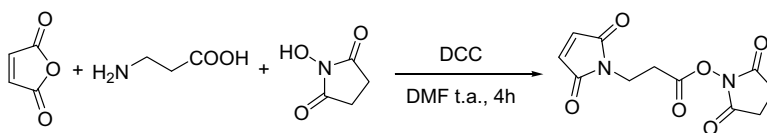


Figura 3.10. Síntesi de l'agent entrecruador SMP.

3.4.1. Proteïnes/polisacàrids transportadors

L'elecció de la proteïna transportadora és molt important alhora de la immunització, ja que aquesta ha de ser suficientment diferent a les proteïnes de l'animal hoste per poder induir la resposta immune.

Normalment, l'hemocianina (HCH) és una de les proteïnes més utilitzades pel seu elevat potencial immunogènic. En el nostre cas, els haptens escollits van ser units covalentment a la proteïna a través dels grups amino d'aquesta.

L'altra proteïna escollida per a la immunització va ser la Polilisina (PLys). En aquest cas, la PLys va ser unida covalentment a l'haptè provinent de l'amoxicil·lina protegida amb el grup Teoc- (haptè tipus 1). Es coneix que la PLys no és precisament una bona candidata, ja que la resposta immunogènica que genera no és massa alta. En aquest cas, l'elecció es va fer per altres motius. L'haptè emprat estava protegit en forma de teoc. La seva desprotecció, tot i que es fa en condicions suaus, només es dona en solvents orgànics, ja que l'H₂O inhibeix el reactiu que s'utilitza. L'única proteïna que ens va permetre treballar en condicions orgàniques va ser la PLys.

La albúmina de sèrum boví (BSA) i l'aminodextrà (AD) van ser escollits per la preparació dels antígens. Els aminodextrans són polisacàrids hidròfils que poden unir-se als grups carboxílics. Tant la BSA com l'AD van ser escollits per eliminar les interferències produïdes per les fraccions dels anticossos policlonals creats contra les proteïnes utilitzades per a la immunització (Polilisina i hemocianina). A la **Figura 3.11.** s'observen la representació esquemàtica del 4 transportadors utilitzats.

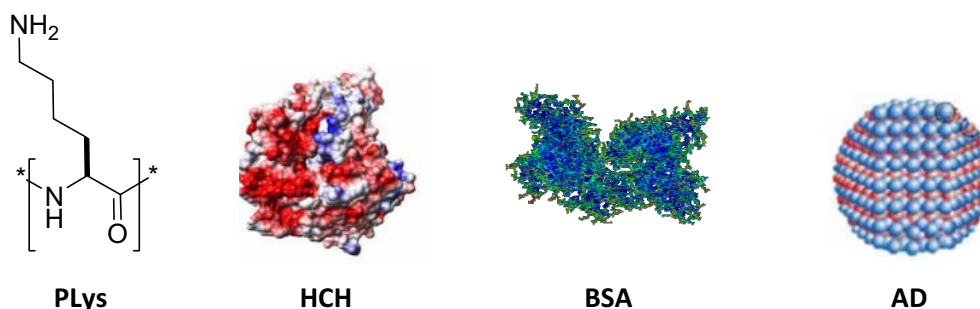


Figura 3.11. Tipus de transportadors utilitzats per a la producció d'antígens i immunògens.

3.4.2. Nomenclatura dels antígens i immunògens

En aquest treball, s'han anomenant els antígens i immunògens en funció dels seus tres constituents (l'haptè, l'agent entrecruador i el polímer transportador). A cada penicil·lina se li va donar un codi de 3 o 4 lletres; amoxicil·lina = Amx, ampil·lina = Amp, Penicil·lina G = PenG i Penicil·lina V = Pen V. El número que segueix a les penicil·lines indica el tipus de conjugació emprat per unir-les a les proteïnes. Pel que fa als agents entrecruadors, es van anomenar com es descriu a continuació; N-SMP = Mp, N-SI = I i N-SBr = Br. I finalment, es menciona el nom de la proteïna.

Un exemple seria el Amx2-Mp-BSA. Aquest antigen es de tipus 2 i es compon d'amoxicil·lina com a haptè, un braç espaiador amb un grup tiol, grup maleimido com a agent entrecruador i la BSA com a proteïna. A la **Taula 3.1.** següent s'observen tots els antígens i immunògens que es van preparar.

Taula 3.1. Esquema resum de la nomenclatura dels antígens i immunògens.

	Haptè ^a	Agent entrecreuerador	Proteïna transportadora	Nomenclatura
Immunogen ^b	Amoxicil·lina	-	Polilisina	Amx1-PLL
	Amoxicil·lina	N-SBr	Hemocianina	Amx2-Br-HCH
	Amoxicil·lina	N-SMP	Hemocianina	Amx2-Mp-HCH
Grup 1	Amoxicil·lina	-	Aminodextrà	Amx1-AD
	Ampicil·lina	-	Aminodextrà	Amp1-AD
	Penicil·lina G	-	Aminodextrà	PenG1-AD
	Penicil·lina V	-	Aminodextrà	PenV1-AD
	Amoxicil·lina	-	BSA	Amx1-BSA
Grup 2	Amoxicil·lina	N-SMP	BSA	Amx2-Mp-BSA
	Amoxicil·lina	N-SMP	Aminodextrà	Amx2-Mp-AD
	Amoxicil·lina	N-SI	BSA	Amx2-I-BSA
	Ampicil·lina	N-SMP	BSA	Amp2-Mp-BSA
	Ampicil·lina	N-SMP	Aminodextrà	Amp2-Mp-AD
	Ampicil·lina	N-SI	BSA	Amp2-I-BSA
	Amoxicil·lina	N-SBr	BSA	Amx2-Br-BSA
Grup 3	Amoxicil·lina	N-SI	BSA	Amx3-I-BSA
Grup 4	Amoxicil·lina	-	BSA	Amx4-BSA
	Ampicil·lina	-	BSA	Amp4-BSA
	Penicil·lina V	-	BSA	PenV4-BSA
	Penicil·lina G	-	BSA	PenG4-BSA

^a Amb o sense braç espaïador.

^b Els immunògens en color vermell van ser utilitzats per preparar els anticossos policlonals i els de color verd els anticossos monoclonals.

3.5. Producció dels antígens i immunògens

A continuació es detallen els immunògens i antígens sintetitzats així com els procediments que es van utilitzar per a la seva preparació.

Per a la producció dels anticossos policlonals, els immunògens utilitzats van ser Amx1-PLys i Amx2-Br-HCH. Els antisèrums 214, 215, 216 van ser obtinguts amb l'Amx1-PLys i els antisèrums 217, 218, 219 amb l'Amx2-Br-HCH. Per la producció dels anticossos monoclonals es va utilitzar l'immunogen Amx2-M-HCH. Els protocols d'immunització es descriuen més endavant (Part experimental apartat 7.2.3.1.). La **Figura 3.12.** mostra les àrees exposades potencialment antigèniques de cada immunogen. La posició del braç espaïador o del entrecreuerador definirà l'especificitat dels anticossos produïts.

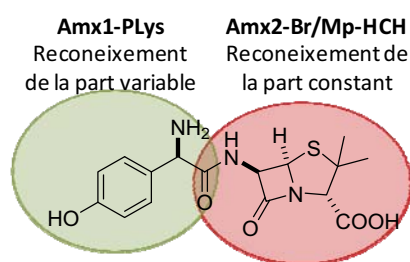


Figura 3.12. Exposició dels epítops d'amoxicil·lina segons l'immunogen utilitzat.

L'immunogen Amx1-PLys és ideal per a la producció d'anticossos específics contra amoxicil·lina, ja que la part variable de l'amoxicil·lina, és la que queda més exposada al sistema immune. Els conjugats Amx2-Br-HCH i Amx2-Mp-HCH van ser escollit perquè exposen a la vegada l'anell β -lactàmic i el grup fenol.

3.5.1. Antígens de grup 1

Els antígens de grup 1 són els que tenen la penicil·lina unida a la proteïna a través del grup carboxílic de l'anell de tiazolidina mitjançant un enllaç amida (**Figura 3.13.**). En aquest cas s'utilitza una carbodiimida per la conjugació.

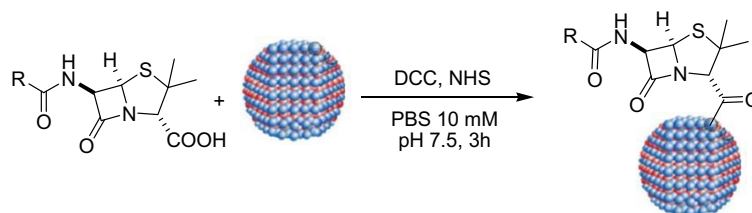


Figura 3.13. Conjugació de les penicil·lines a la proteïna mitjançant el mètode de l'ester actiu.

Els antígens produïts van ser Amx1-AD, Amp1-AD, PenG1-AD i PenV1-AD, i l'immunogen Amx1-PLys. Pel cas de l'ampicil·lina i l'amoxicil·lina es varen utilitzar els seus derivats corresponents amb el grup amino protegit amb el grup Teoc (**Figura 3.4.**). Caldria, per tant, un pas posterior de desprotecció d'aquest grup. Es va escollir la sal de fluorur de tetrabutilamoni en DMF per a dur la desprotecció (**Figura 3.14.**). Aquesta desprotecció es va estudiar prèviament utilitzant amoxicil·lina protegida però sense conjugar, i seguint la reacció per HPLC. Es va trobar que en 20 min a temperatura ambient, l'amoxicil·lina es desprotegia amb una conversió de pràcticament el 100 %.

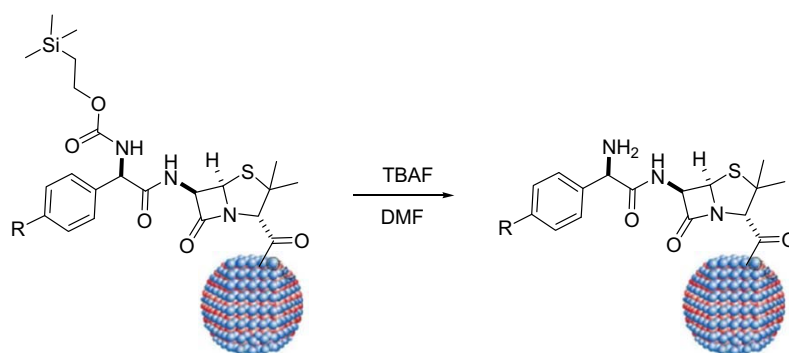


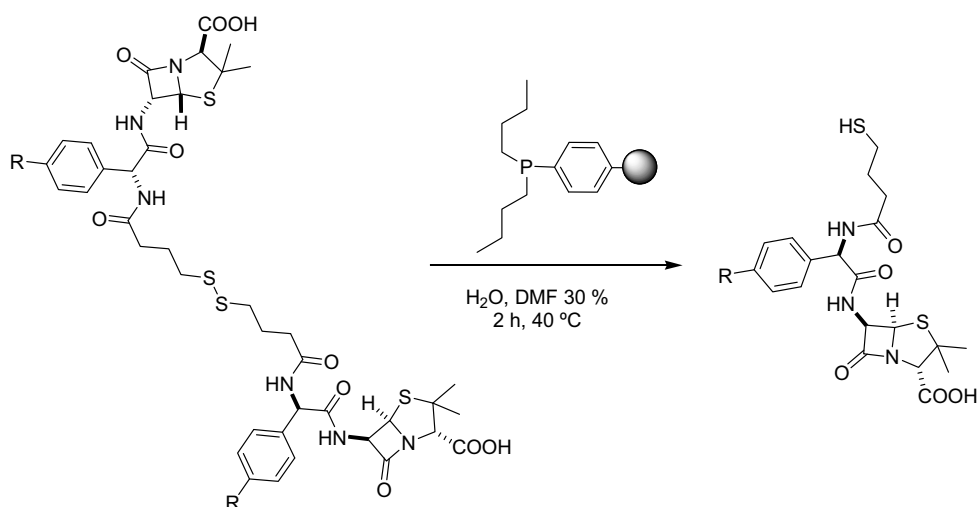
Figura 3.14. Etapa de desprotecció del grup protector Teoc.

Es va utilitzar AD i PLYs com a transportadors perquè conservaven les seves propietats de solubilitat després de l'etapa de desprotecció en DMF. Altres transportadors, com la BSA, desnaturalitzaven quan es solubilitzaven en DMF i deixaven de ser solubles posteriorment en solucions aquoses.

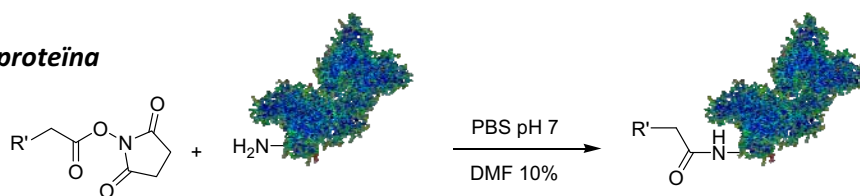
3.5.2. Antígens de grup 2

Els antígens i immunògens del grup 2 es van enllaçar a la proteïna a través del grup tiol del braç espaciador, prèviament unit a l'estructura penicil·línica a través de la formació del dímer mitjançant un pont disulfur. La preparació d'aquests conjugats es fa en diverses etapes. Mentre es redueix el pont disulfur amb una reina de fosfina (DBPP), s'uneix el grup entrecruador (N-SI/SMMP) a la proteïna a través dels grups amino d'aquesta. Finalment, el grup tiol lliure de la primera etapa s'uneix al grup funcional del braç espaciador ancorat a la proteïna. A la **Figura 3.15.** es mostren les tres etapes sintètiques que es van dur a terme per obtenir els antígens i immunògens de tipus 2. Per tal d'establir les millors condicions de reducció del pont disulfur, es va dur a terme una optimització de la reacció per HPLC, variant temps de reacció, temperatura i quantitat de resina reductora utilitzada (**Taula 3.3.**).

Reducció del pont disulfur



Activació de la proteïna



Conjugació de l'haptè a la proteïna

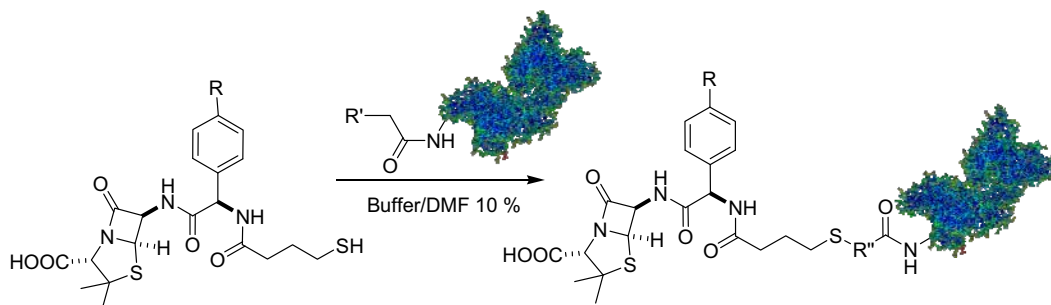


Figura 3.15. Seqüència sintètica per a produir els antígens de grup 2. On R = H per a l'ampicil·lina i R = OH per a l'amoxicil·lina. R' = Br, I o SMP. R''=CH₂ o CH₂CH₂C₄O₂H₂.

Taula 3.3. Resultats obtinguts a les proves d'optimització de la reacció de reducció.

Reacció	Quantitat de resina (mg) per cada 10 μ mol de dímer	Temps de reacció (min)	Temperatura de reacció ($^{\circ}$ C)	Rendiment (%)
1	25	60	25	35
2	50	60	25	44
3	100	60	25	49
4	100	10	25	33
5	100	30	25	38
6	100	60	40	83
7	100	60	50	90
8	100	5	40	62
9	100	30	40	64

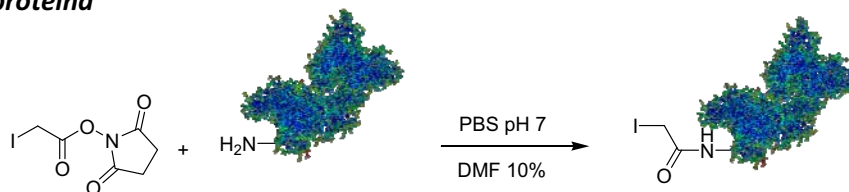
Les condicions òptimes per portar a terme la reducció del pont disulfur van ser utilitzar 100 mg de resina durant 60 minuts a 40 $^{\circ}$ C per cada 10 μ mol de dímer. Tot i que el rendiment fos més elevat treballant a 50 $^{\circ}$ C, per HPLC varem veure que també apareixien altres productes de degradació. Es va veure que tant la quantitat de resina utilitzada com el temps de reacció eren directament proporcional al rendiment i no afectaven a la generació d'impureses.

Els antígens que es van preparar mitjançant aquesta estratègia van ser Amx2-Mp-BSA, Amp2-Mp-BSA, Amx2-Mp-AD, Amp2-Mp-AD, Amx2-I-BSA i Amp2-I-BSA, i els immunògens Amx2-Br-HCH i Amx2-Mp-HCH.

3.5.3. Antígens de grup 3

El grup 3 només conté un antígen, el Amx3-I-BSA. En aquest cas, el grup amino de l'amoxicil·lina s'uneix a la BSA mitjançant el desplaçament d'un iode, de l'agent entrecruador prèviament unit a la proteïna. Aquest competidor difereix dels competidors del grup 2 en el fet de que no s'utilitza el dímer de l'amoxicil·lina sinó l'amoxicil·lina directament (**Figura 3.16.**).

Activació de la proteïna



Conjugació de l'haptè a la proteïna

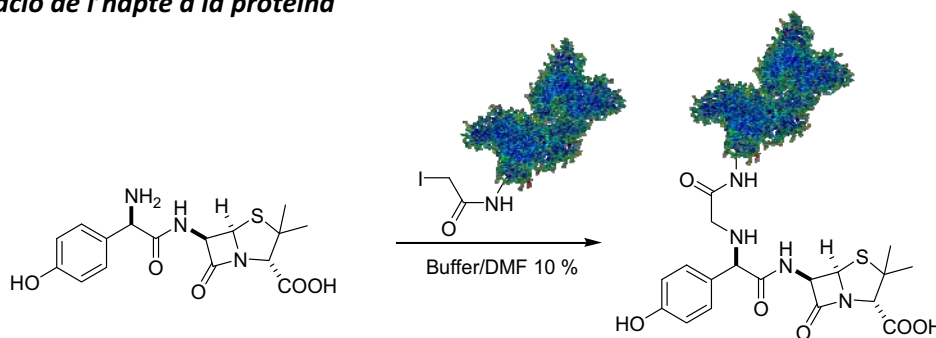


Figura 3.16. Producció de l'antigen de tipus 3.

3.5.4. Antígens de grup 4

Finalment, per produir els antígens de grup 4 només va caldre fer reaccionar, en tampó de K_2CO_3 pH 11, la BSA com a proteïna transportadora i les 4 penicil·lines més comuns (Amoxicil·lina, ampil·lina, penicil·lina G i penicil·lina V). La reacció de conjugació es descriu en la **Figura 3.17**.

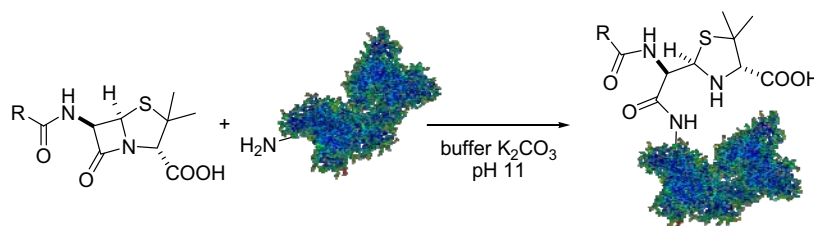


Figura 3.17. Obtenció dels antígens de grup 4. El grup R indica la part variable de les penicil·lines G, V, amoxicil·lina i ampil·lina.

3.6. Caracterització dels antígens

El grau de conjugació dels diferents haptens a les proteïnes es va obtenir per espectrometria de masses MALDI-TOF. El MALDI-TOF (*Matrix assisted laser*

desorption/ionization- time of flight mass spectrometry) es basa en la ionització de les diferents molècules mitjançant un feix làser. Les molècules ionitzades passen a l'espectròmetre de masses un espectre de relació massa/càrrega de la molècula en qüestió. Per poder ionitzar les molècules, aquesta tècnica fa ús de matrius que co-cristal·litzen amb la molècula objectiu. Els cristalls de la matriu absorbeixen l'energia del làser i la transfereixen a les nostres molècules. En aquest cas es va fer servir l'àcid sinapínic com a matriu (àcid 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinnàmic).

L'analitzador TOF utilitza un cap magnètic per accelerar els ions i mesura el temps que triguen aquests ions en arribar al detector. Per tant, si les partícules tenen la mateixa càrrega, la velocitat dependrà només de la seva massa. Els ions més lleugers arriben primer al detector. Una de les avantatges més grans del MALDI-TOF és que pot arribar a detectar masses molt elevades, de l'ordre de 100.000 Da. Per tant, el MALDI-TOF es pot fer servir per detectar albúmines (BSA, CONA, OVA), però presenta problemes per detectar polímers com ara l'aminodextrà o la polilisina, així com proteïnes d'elevat pes molecular com la hemocianina.

Per tal de caracteritzar els immunògens, el que es fa normalment és preparar en paral·lel una petita quantitat del conjugat però amb BSA. S'assumeix que la conjugació a la hemocianina ha anat bé o no, comprovant el grau de conjugació de l'anàleg amb BSA. El grau de conjugació es determina a través de la següent fórmula:

$$x = \frac{\text{Mass(Protein - linker - hapten)} - \text{Mass(Protein - linker)}}{\text{Mass(monomer)}}$$

En el cas dels antígens preparats utilitzant agents entrecruadors que contenen bromur o iodur, es va haver de tenir en compte en el càlcul del grau de conjugació la pèrdua d'aquest halogen. Els resultats són indicatius però si la proteïna augmenta significativament de massa és un bon senyal en termes de conjugació. A la **Taula 3.2.** s'observen els graus de conjugació obtinguts.

Taula 3.2. Resultats del MALDI-TOF per als conjugats de BSA.

Antigen	Unió proteïna-entrecruador	Densitat d'haptè ^a
Amx2-I-BSA	17	5
Amx2-Mp-BSA	14	7
Amp2-I-BSA	17	5
Amp2-Mp-BSA	9	4
Amx2-Br-BSA	11	5
Amx3-I-BSA	13	4
Amx4-BSA	-	2
Amp4-BSA	-	3
PenV4-BSA	-	2
PenG4-BSA	-	3

^a Número de molècules de penicil·lina unides a la proteïna.

3.7. Resum i conclusions del capítol

En resum en aquest capítol s'ha aconseguit:

- Sintetitzar diferents haptens provinents de les quatre penicil·lines principals (amoxicil·lina, ampil·lina, penicil·lina G i penicil·lina V) amb bons rendiments.
- Produir un total de 17 antígens diferents i 3 immunògens. Els 17 conjugats han estat dissenyats per a exposar diferents parts de les penicil·lines tant en forma oberta com tancada.

Tots aquests compostos seran les eines principals per a poder desenvolupar l'immunoassaig de detecció de penicil·lines i el sistema de diagnòstic d'al·lèrgies, descrits en els capítols 4 i 5 d'aquesta Tesi.

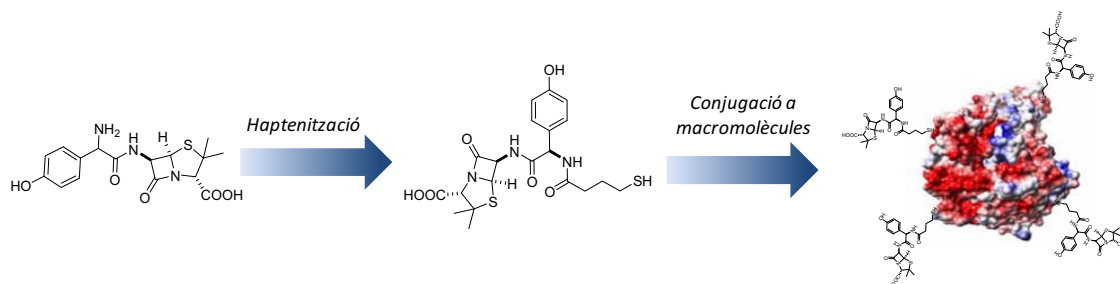


Figura 3.18. Resum esquemàtic del contingut d'aquest capítol.

4. Detecció d'amoxicil·lina en mostres de llet

4.1. Els immunoassaigs

4.1.1. La importància de l'anticòs en els immunoassaigs

Els anticossos són proteïnes de la família de les immunoglobulines. Aquest tipus de proteïna es genera a partir de la resposta immune a un agent extern (antigen) per part de l'organisme hoste. Existeixen diferents famílies d'immunoglobulines com ja s'ha explicat a l'apartat 1.2.5. de la introducció. En el sèrum de mamífers, la classe més abundant és la de les IgGs, representant un 80% del total de les immunoglobulines. Degut a això, les IgG són les més utilitzades a les tècniques immunoquímiques.

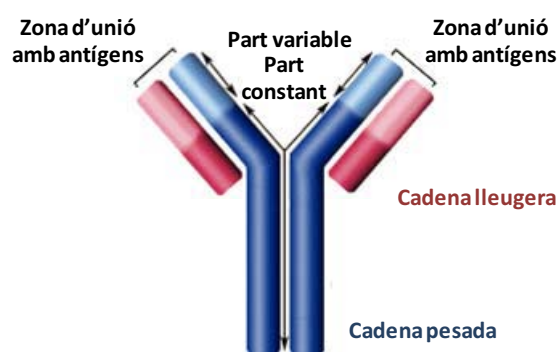


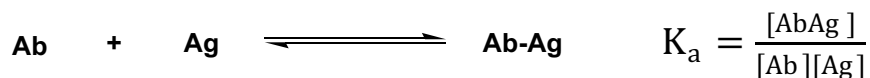
Figura 4.1. Estructura general d'una immunoglobulina.

Els anticossos s'han utilitzat àmpliament com a instrument de recerca mitjançant diferents tipus de tècniques com la citometria de flux, el Western blot o els immunoassaigs (IAs) entre d'altres. Pel cas dels immunoassaigs, aquests es poden definir com mètodes analítics que permeten selectivament la identificació i quantificació de la diana objectiu que es vol analitzar, tant siguin molècules discretes com proteïnes.

El primer immunoassaig va ser desenvolupat per Yalow *et al.* [204, 205] i tenia com a finalitat detectar d'insulina en sèrum humà. Era del tipus RIA (radioimmunoassaig) i emprava anticossos específics contra insulina i un marcador radioactiu. A partir d'aquest moment, les tècniques immunoquímiques cada vegada van ser més importants. Actualment, els immunoassaigs s'apliquen en àrees tan diferents com la medicina, l'agroalimentària, el medioambient, etc...

Els immunoassaigs es basen en la unió antígen-anticòs, on els centres actius de l'anticòs s'uneixen específicament a una zona concreta anomenada epítop de l'antigen. Aquest reconeixement depèn principalment de possibles interaccions electroestàtiques, ponts d'hidrogen, forces de Van der Waals o interaccions hidrofòbiques entre d'altres, tot i que la conformació espacial de l'antigen és molt important per poder entrar en la cavitat del centre actiu de l'anticòs. Així doncs, la interacció entre l'anticòs i l'antigen dependrà de les forces electrostàtiques, els ponts d'hidrogen i les interaccions hidrofòbiques com les forces de Van der Waals.

Un cop es forma el complex anticòs-antigen (Ab-Ag) i aquest arriba a l'equilibri, la constant d'afinitat K_a es defineix mitjançant l'equació de Michaelis-Menten



L'ordre de magnitud que aquesta constant pot arribar a assolir és de 10^{10} M^{-1} . Gràcies a aquest elevat grau d'afinitat, els anticossos s'han utilitzat pel desenvolupament de tècniques analítiques per la detecció tant de organismes vius (virus, bacteris i cèl·lules), macromolècules (proteïnes, polisacàrids, DNA,...), com molècules de baix pes molecular (contaminants, fàrmacs, biomarcadors,...). També s'han desenvolupat mètodes de tractament de mostra per aïllar el compost d'interès d'una matriu complexa (columnes d'immunoafinitat, partícules magnètiques,...).

Per poder produir un anticòs (Ab) contra un analit determinat cal que aquest tingui un pes molecular superior a 5000 Da, ja que pel contrari la resposta immune és inexistent en l'animal hoste. Per tant, si es pretén obtenir anticossos específics contra compostos de baix pes molecular cal sintetitzar un anàleg a l'analit que mimetitzi les seves propietats físico-químiques (haptè), i posteriorment unir-lo a una proteïna transportadora[200]. El conjunt generat serà capaç de produir una resposta immune.

4.1.2. Tipus d'immunoassaigs

Els immunoassaigs es poden classificar en dos tipus: homogenis i heterogenis. En els assaigs homogenis no hi ha separació entre la fase lliure i unida abans de l'etapa de detecció, és l'enllaç Ag-Ab el que modula l'activitat de l'enzim o marcador. Tot i que, aquest tipus d'immunoassaig és més ràpid que l'assaig heterogeni, en molts casos presenta efectes matrius importants i detectabilitat insuficient.

En l'assaig heterogeni, un dels immunoreactius està unit a un suport sòlid, fent possible la separació de l'analit d'interès de la seva matriu, sense necessitat de modular l'activitat del marcador.

Els immunoassaigs també poden classificar-se en funció del marcador que utilitzin, que a la fi és el que ens donarà la resposta de l'assaig. Hi ha 5 tipus diferents – els radioactius, els enzimàtics, els fluorescents, els luminescents i els magnètics. Els radioimmunoassaigs utilitzen anticossos o antígens units a substàncies radioactives (normalment iode). Val a dir que, aquest marcador s'utilitza molt poc avui dia a causa de la seva perillositat.

Els fluoroimmunoassaigs utilitzen marcadors fluorescents. Hi ha una gran varietat de fluoròfors com les cianines, les rodamines o les fluoresceïnes, i fins i tot les ficobiliproteïnes d'algues. Els assaigs químioluminiscent són similars als fluorescents però utilitzen reactius que generen llum.

Els immunoassaigs magnètics (MIA) utilitzen partícules magnètiques conjugades a l'antigen o bé a l'anticòs. En aquests assaigs, es quantifica la unió amb l'analit mesurant el camp magnètic induït per les partícules i es correlaciona directament amb l'analit present en la mostra [206].

Segurament, els marcadors més utilitzats són els enzimàtics. Aquests reaccionen amb un determinat substrat, catalitzant una reacció colorimètrica que absorbeix en l'espectre del visible (ELISA). Els enzims més utilitzats són la horseradish peroxidasa (HRP), la glucosaoxidasa (GO), l'alcalinofosfatasa (AP) i la β -galactosidasa (β G).

En general, el senyal detectat en un immunoassaig prové del marcador unit covalentment a un dels immunoreactius, ja sigui en l'antigen, l'anticòs, o algun reactiu específic secundari. Bàsicament hi ha tres tipus d'immunoassaigs depenent principalment del tipus d'analit que es vulgui estudiar. Normalment s'utilitzen assaigs tipus Sandvitx i assaigs no competitiu per a organismes cel·lulars o molècules d'elevat pes molecular, mentre que els assaigs competitiu estan quasi reservats per la detecció de molècules de baix pes molecular

(Figura 4.2.). Aquests últims poden ser en format directe o indirecte, en funció de quin immunoreactiu vagi anclat al suport sòlid.

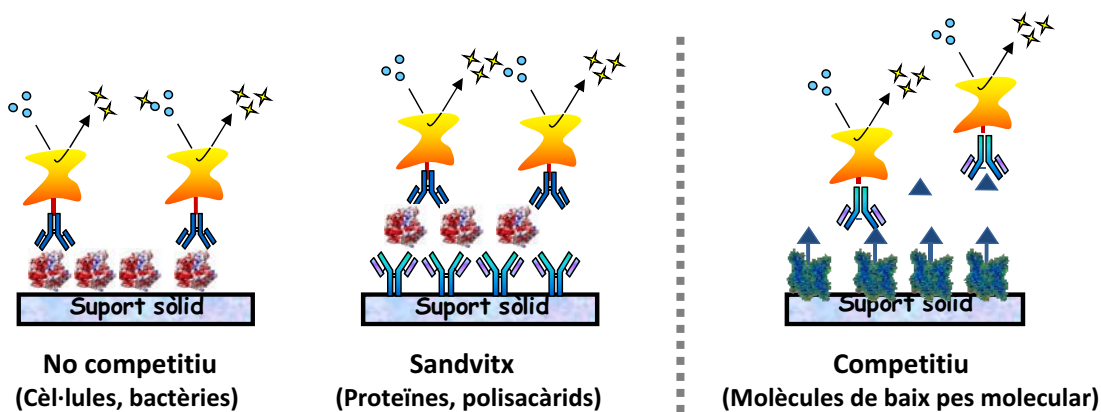


Figura 4.2. Representació esquemàtica dels immunoassaigs no competitiu, de tipus sandvitx i competitiu.

Assaigs competitiu directes

L'anticòs s'uneix al suport sòlid, i en el moment de la competència s'estableix un equilibri entre l'analit i un antigen marcat per l'anticòs. Els reactius sobrants s'eliminen i es mesura la quantitat final d'antigen marcat que ha quedat unit al suport sòlid a través de l'anticòs. Una disminució del senyal és inversament proporcional a la quantitat d'analit present a la mostra.

Assaig competitiu indirecte

En aquest cas l'antigen és el que s'uneix al suport sòlid, mentre que resten en solució l'anticòs i l'analit. Després d'una etapa de rentat, es mesura la quantitat d'anticòs final unit al suport a través de l'antigen. Igual que abans, el senyal és inversament proporcional a la concentració d'anticòs.

4.1.3. Anticossos policlonals vers monoclonals (PAbs vs MAbs)

4.1.3.1. Descripció general

Els anticossos policlonals s'obtenen directament dels sèrums dels mamífers, molt comunament de conills, però també es poden obtenir de cabres, porcs, ovelles, cavalls o camells. Normalment, cal immunitzar els animals amb l'immunogen específic mesclat prèviament amb un adjuvant. Aquest oli té principalment dues funcions. Ajuda a l'activació de la resposta immune alhora que facilita que hi hagi una alliberació controlada de l'immunogen dins l'animal hoste. L'immunogen es subministra mitjançant injeccions intradèrmiques. Per cada animal, tant el nombre d'immunitzacions com les concentracions d'immunògens són diferents. Pel cas concret del conill, normalment s'utilitzen uns 100 µg d'immunogen per immunització, un cop al mes durant 6 mesos. Quan es considera que s'ha arribat al nivell màxim d'anticossos específics es recull la sang i s'obté l'antisèrum, el qual es pot utilitzar directament com a immunoreactiu. Tot i això es poden aïllar les IgGs del sèrum per precipitació amb solucions salines o mitjançant columnes d'immunoafinitat. L'antisèrum normalment conté una mescla heteròloga d'IgGs que reconeixen diferents parts de l'estructura dels immunògens amb una elevada especificitat i sensibilitat, i és per això que s'identifica com a sèrum policlonal.

Els anticossos monoclonals s'obtenen a partir de la fusió de les cèl·lules B de la melsa de l'animal exposat a l'antigen amb cèl·lules tumorals de mieloma múltiple (**Figura 4.3.**). Aquesta fusió origina els hibridomes, cèl·lules immortals que tenen la capacitat de multiplicar-se amb molta facilitat i indefinidament. Aquests hibridomes han incorporat els gens que codifiquen els anticossos. Un cultiu cel·lular d'aquests hibridomes fa que s'agrupin en colònies, on cadascuna d'elles és productora d'un únic tipus d'anticòs específic contra un únic epítop. Les diferents colònies d'hibridoma es poden aïllar fàcilment, i així avaluar l'especificitat dels anticossos que produeixen [207]. Això permet fer una selecció dels clons i els que interessin més s'aïllen i es tornen a clonar. Aquest procés es va repetint fins trobar un únic clon específic contra l'analit que es vol detectar. La producció d'anticossos mitjançant aquesta tècnica proporciona una font inesgotable d'anticossos, però com a contrapartida cal mencionar que existeix el perill que durant el cribatge dels diferents clons es puguin perdre aquells de major afinitat, a més de ser una tècnica molt més cara i tediosa en comparació amb la utilitzada per l'obtenció dels PAbs.

Producció d'anticossos monoclonals i policlonals

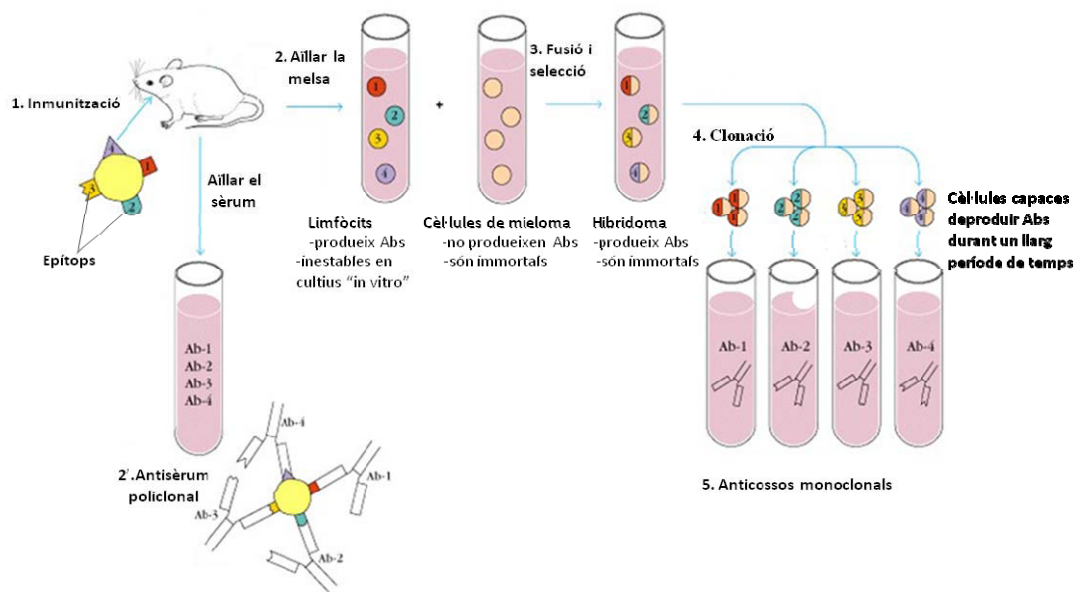


Figura 4.3. Esquemes de producció d'anticossos monoclonals i policlonals.

4.1.3.2. Avantatges i desavantatges dels PAbs i MABs

L'especificitat de l'antisèrum policlonal es determina per l'estructura química dels immunoconjugats, pel calendari d'immunització i pel sistema immune de l'animal. Per compostos d'elevat pes molecular si el que es vol reconèixer és un epítoc concret de la molècula, els PABs no són els més apropiats perquè generaran anticossos contra diversos epítocs de la molècula. Tot i això és una tècnica senzilla i acostuma a donar bons resultats per un ampli espectre d'immunògens.

En el cas dels MABs el procés de criatge és llarg i costós. Tot i això, si funciona, es poden produir anticossos específics només d'un únic epítoc. A la Taula 4.1. es pot observar les diferències entre anticossos policlonals i monoclonals.

Taula 4.1. Avantatges i desavantatges dels anticossos policlonals i monoclonals.	
Anticossos policlonals	Anticossos monoclonals
Reconeix múltiples epítocs de l'immunogen	Producció cara
Hi ha variacions entre diferents batchs	Es requereix una tecnologia elevada
Es requereix poca tecnologia	Requereix personal especialitzat
Poc nivell d'habilitat	Els híbridomes són immortals
	Produeix gran quantitat d'anticossos específics
	Només reconeix un epítoc de l'immunogen

4.2. Protocol d'immunització per PAb

Normalment s'immunitzen tres conills per immunogen. En aquest cas es van utilitzar els immunògens Amx1-PLys (214, 215 i 216) i Amx2-Br-HCH (217, 218 i 219), seguint el protocol d'immunització descrit a la part experimental (**Figura 4.4.**). A cada conill se li van inocular 100 µg d'immunogen barrejat amb l'adjuvant de Freund, substància oliosa que s'empra per millorar i estimular la resposta immune així com per facilitar un alliberament lent de l'antigen. Aquest procés es va repetir cada mes durant un total de sis mesos, fins que no es va observar variació en el títol d'anticòs.

Producció d'anticossos policlonals

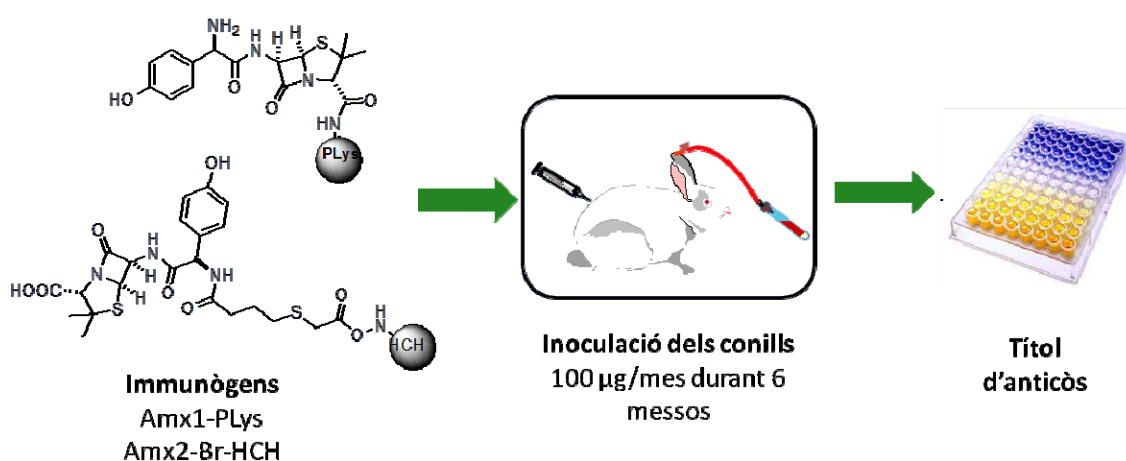


Figura 4.4. Esquemes de producció d'anticossos policlonals.

4.2.1. Evolució del títol de l'anticòs

Abans d'iniciar el protocol d'immunització es va extreure una petita quantitat de sang de cada conill (antisèrum preimmune), la qual es va fer servir com a sèrum control no específic. Amb aquest antisèrum i amb els que es van anar extraient de manera periòdica cada mes, aproximadament entre 8 i 10 dies posteriors a la inoculació, es van realitzar els controls per avaluar el títol d'anticossos. Aquests controls es van fer mitjançant un assaig ELISA no competitiu en format indirecte. L'assaig consistia en immobilitzar sobre una superfície el mateix compost utilitzat com a immunogen però unit a una altra proteïna (antigen homòleg). Posteriorment s'afegien els diversos antisèrums obtinguts, i finalment un segon anticòs marcat

enzimàticament que reconeixia la fracció constant dels anticossos de conill. El senyal obtingut en aquest cas era directament proporcional a la quantitat d'anticòs específic que hi ha en el sèrum.

Els conills 214, 215 i 216 no van produir específics, i per tant van ser descartats per a posteriors investigacions. És possible que l'haptè no fos suficientment immunogènic o que s'hagués danyat durant el procés de conjugació. També és possible que l'amoxicil·lina no s'hagués conjugat a la proteïna com s'esperava.

Els anticossos produïts en els conills 217, 218 i 219, si van donar una resposta positiva al seu antigen homòleg.

4.3. Avaluació dels anticossos policlonals

Els tres antisèrums obtinguts es varen assajar amb tots els antígens que s'havien sintetitzat i descrit a l'apartat 3.5. del **capítol 3**. El càlcul de les concentracions dels immunoreactius es van fer mitjançant assajos bidimensionals (2D), on es variaven simultàniament les concentracions tant dels antisèrums com dels antígens. D'aquesta manera s'obtenien les millors combinacions Ag/As.

Els resultats d'aquests assaigs bidimensionals (2D) no competitiu es poden observar a la **Taula 4.2.** Els anticossos van ser capaços de detectar tots els competidors. Els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 4.2.** on s'observen els reconeixements més elevats per una dilució d'antisèrum 1/4000 i una concentració de competidor de 0.5 µg/mL i també les combinacions menys reconegudes, utilitzant una dilució d'antisèrum 1/1000 i una concentració de competidor de 1 µg/mL.

Segons aquests resultats es pot deduir que els anticossos tenen més afinitat pels competidors del grup 2 i, en un menor grau també reconeixen els competidors dels altres grups. Aquests resultats entren dintre de la normalitat tenint en compte que van ser immunitzats amb l'immunogen Amx2-Br-HCH.

Figura 4.2. Reconeixement dels competidors per part dels anticossos 217, 218, 219. Els colors representen l'absorbància a 450 nm.

	Anticòs (1/4000)			
		Ab217	Ab218	Ab219
Antigen (0.5 µg/mL)	Amx2-Mp-BSA	1.8	1.3	2.0
	Amx2-I-BSA	2.2	2.2	1.8
	Amx2-Mp-AD	1.0	1.2	1.8
	Amp2-Mp-BSA	0.8	2.0	0.9
	Amp2-I-BSA	2.0	2.1	1.4
	Amp2-Mp-AD	2.0	2.2	1.3
	Anticòs (1/1000)			
		Ab217	Ab218	Ab219
Antigen (1 µg/mL)	Amx1-AD	0.5	0.3	0.4
	PenG1-AD	0.3	1.5	0.5
	PenV1-AD	0.3	1.8	0.6
	Amp1-AD	0.3	0.3	0.2
	Amx3-I-BSA	0.9	1.4	0.9

	0-0.5
	0.5-1
	1-1.5
	1.5-2
	2-2.5

4.4. Assaigs competitius

Com ja s'ha comentat anteriorment, per la detecció i quantificació de molècules de baix pes molecular s'utilitzen els assaigs competitius. En aquest cas es va utilitzar el format indirecte. Molt breument, aquest consisteix en immobilitzar sobre el suport sòlid l'antigen o competidor, mentre que en solució es troba l'anticòs junt amb l'analit a determinar. Després d'una etapa de rentat, mitjançant un marcador secundari s'obté una resposta inversament proporcional a la concentració d'analit present en la mostra inicial.

Aquests assaigs es van portar a terme utilitzant les relacions Ag/As obtingudes prèviament en els assaigs 2D. Per avaluar la detectabilitat dels anticossos es va afegir l'analit (amoxicil·lina en el nostre cas) a diverses concentracions molars. En la **Figura 4.5.** s'observa una corba típica d'inhibició, on es representa el logaritme de la concentració d'analit en front del senyal obtingut, en aquest cas absorbància. Per tant, a major concentració d'analit menor és el senyal.

La corba d'inhibició s'ajusta a una fórmula de 4 paràmetres,

$$Y = B + \frac{A - B}{1 - \left(\frac{X}{C}\right)^D}$$

On A és la senyal màxima, B és la senyal mínima, C és la concentració al 50% de la senyal màxima, i D és el pendent del punt d'inflexió de la corba sigmoïdal. El límit de detecció (LOD) es defineix com la concentració obtinguda al 90% de la senyal màxima (IC_{90}) i l'interval de treball (IC_{80} - IC_{20}) defineix els marges de concentració quantificable de l'analit. Mentre que el LOD marca la detectabilitat de l'assaig, el pendent de la recta marca la sensibilitat de l'assaig. Pendents molt alts ($D \gg 1$) fan que els intervals de treball siguin molt estrets. L'assaig és molt sensible a canvis de concentració de l'analit. És convenient desenvolupar assaigs amb pendents al voltant de la unitat.

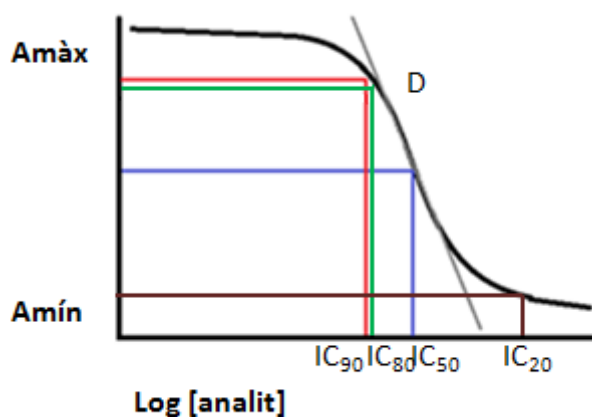


Figura 4.5. Model de la corba de competició.

En el nostre cas, per la realització dels assaigs competitius es van seleccionar tres grups diferents d'analits. Les seves estructures es poden veure a la **Figura 4.6**. Inicialment els assaigs es van desenvolupar per què detectessin principalment l'amoxicil·lina. Però com es volia obtenir un assaig de família també es van provar els antisèrums amb l'ampicil·lina i les penicil·lines G i V. Finalment, tal i com s'explicarà més endavant, es va utilitzar com a analit l'àcid amoxiciloic (amoxicil·lina en forma oberta).

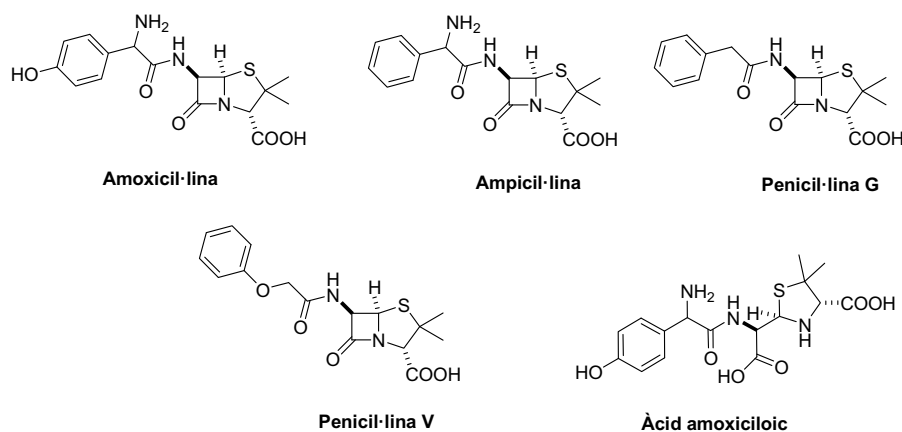


Figura 4.6. Analits utilitzats en els assaigs competitiu.

4.5. Assaigs amb els anticossos policlonals

4.5.1. Resultats i discussió

La **Taula 4.6.** mostra totes les combinacions realitzades utilitzant les tres espècies (anticòs vs. competidor vs. analit). Els colors representen el nivells de detectabilitat, en aquest cas en funció de la IC_{50} . El color vermell representa que s'ha obtingut una corba d'inhibició completa, el color verd representa que la corba d'inhibició és parcial a les concentracions assajades d'analit, i el color blau representa que tot just comença a haver-hi inhibició. Finalment, el color negre indica que no s'observa cap tipus d'inhibició.

Els resultats es divideixen de la següent manera:

- a. Resultats per a les penicil·lines
- b. Resultats per a la forma oberta de l'amoxicil·lina

c. Resultats per a les penicil·lines

L'analit més important en aquest estudi va ser l'amoxicil·lina. S'esperava que els anticossos produïts reconeguessin específicament l'anell β -lactàmic de l'amoxicil·lina i per tant, els mateixos anticossos reconeguessin per analogia la resta de penicil·lines (anticossos de família). Però com es pot observar a la **Taula 4.3.** pràcticament no va haver-hi reconeixement de cap penicil·lina.

Tot i això, l'amoxicil·lina va mostrar un cert grau de reconeixement amb els antisèrums 218 i 219 en front dels antígens PenG1-AD i PenV1-AD. Tot i que la detectabilitat de l'assaig era dolenta, si més no va demostrar que els anticossos reconeixen una part de l'estructura de

l'amoxicil·lina. La **Taula 4.4.** mostra alguns dels millors resultats obtinguts dels assaigs competitiu indirectes realitzats i la **Figura 4.7.** il·lustra aquestes corbes.

Els resultats dels assaigs competitiu indirectes per a l'ampicil·lina es poden observar en la **Taula 4.5.** i **Figura 4.8.** El comportament és molt similar que en els assaigs per l'amoxicil·lina. En els dos casos, l'antisèrum que va reconèixer millor els antibiòtics va ser l'As219, i els competidors van ser el PenV1-AD i el PenG1-AD.

Taula 4.3. Combinacions realitzades pels diferents assaigs competitiu.			
	217	218	219
Amx1-AD	Amx, Amp, PenG, PenV	Amx, Amp, PenG, PenV, àcid amoxiciloic	Amx, Amp, PenG, PenV
Amx2-Mp-BSA	Amx, Amp, PenG, PenV,	Amx, Amp, PenG, PenV,	Amx, Amp, PenG, PenV
Amx2-Mp-AD	Amx, Amp	Amx, Amp	Amx, Amp
Amx2-I-BSA	Amx, Amp, Amx-oberta	Amx, Amp, Amx-oberta	Amx, Amp, Amx-oberta
Amx3-I-BSA	Amx, Amp, PenG, PenV,	Amx, Amp, PenG, PenV,	Amx, Amp, PenG, PenV
Amp1-AD		Amx, Amp, PenG, PenV	-
Amp2-Mp-BSA	Amx, Amp	Amx, Amp	Amx, Amp
Amp2-Mp-AD	Amx, Amp	Amx, Amp	Amx, Amp
Amp2-I-BSA	Amx, Amp, Amx-oberta	Amx, Amp, Amx-oberta	Amx, Amp, Amx-oberta
PenG1-AD	-	Amx, Amp, PenG, PenV, àcid amoxiciloic	Amx, Amp, PenG, PenV
PenV1-AD	-	Amx, Amp, PenG, PenV, àcid amoxiciloic	Amx, Amp, PenG, PenV

Els colors representen els diferents nivell de detectabilitat determinat. En vermell s'indiquen les corbes on s'observa més inhibició, les verdes són corbes que mostren una inhibició intermitja i les blaves que tot just comença la corba d'inhibició. En color negre es representen els assaigs que no competeixen.

Taula 4.4. Corbes de competició per a l'amoxicil·lina.				
Anticòs	As 218	As 219	As 218	As 219
Antigen	PenG1-AD	PenG1-AD	PenV1-AD	PenV1-AD
Analit	Amoxicil·lina	Amoxicil·lina	Amoxicil·lina	Amoxicil·lina
Abs_{max}	0.8599	0.4235	1.052	0.5488
Abs_{min}	0.09874	0.1394	0.1468	0.1559
m	-0.559	-0.9316	-0.9857	-0.794
EC₅₀ (nM)	756.2	157.6	708.1	158.6
EC₅₀ (µg/L)	276.3	57.58	258.7	57.95
R²	0.9753	0.9772	0.9967	0.9954

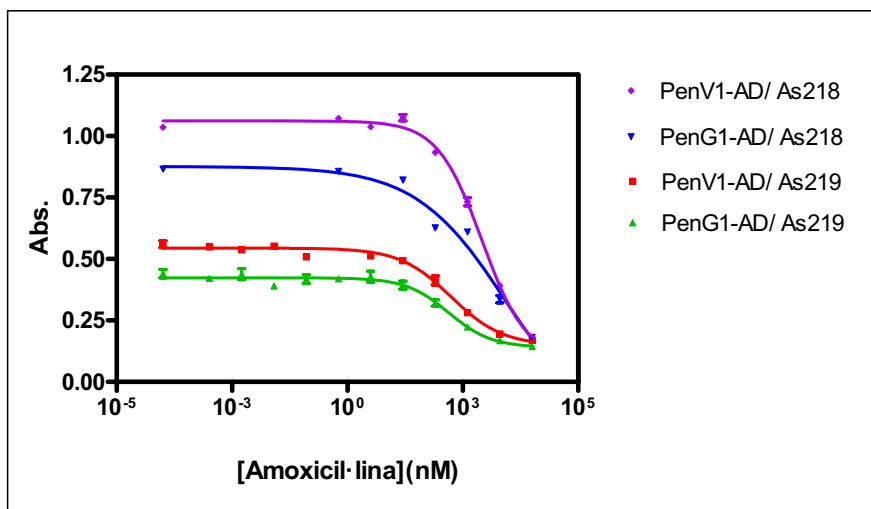


Figura 4.7. Corbes de competició per a l'amoxicil·lina.

Taula 4.5. Corbes de competició per a l'ampicil·lina.				
Anticòs	218	219	218	219
Antigen	PenG1-AD	PenG1-AD	PenV1-AD	PenV1-AD
Analit	Ampicil·lina	Ampicil·lina	Ampicil·lina	Ampicil·lina
Abs _{max}	0.5886	0.4426	0.2963	0.5426
Abs _{min}	0.2286	0.1347	0.1157	0.1606
m	-1.113	-0.7528	-1.314	-0.9685
EC ₅₀ (nM)	1737	136.1	1274	134.4
EC ₅₀ (µg/L)	606.9	47.55	445.15	46.96
R ²	0.9596	0.9938	0.9669	0.9958

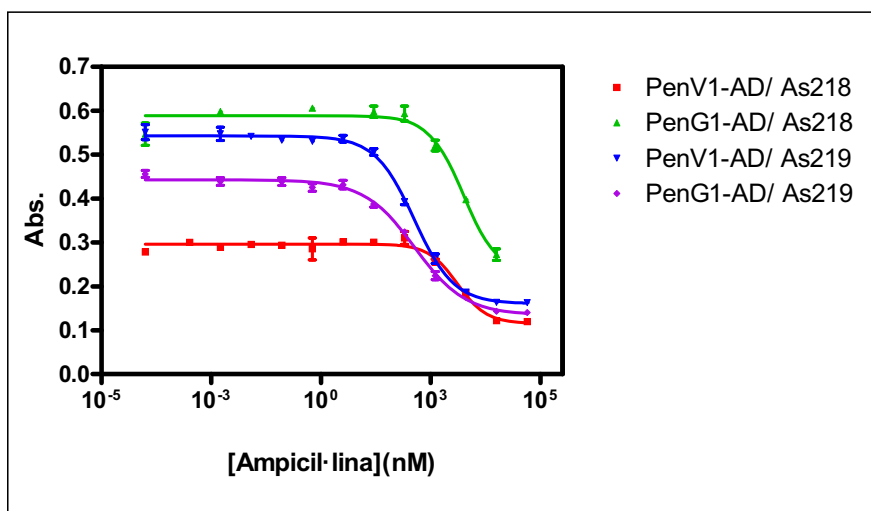


Figura 4.8. Corbes de competició per a l'ampicil·lina.

d. Resultats per a l'àcid amoxiciloic

Els resultats obtinguts fins el moment no van ser massa esperançadors. L'assaig obtingut fins el moment podia detectar amoxicil·lina amb una EC_{50} al voltant dels 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cal recordar que el MRL per aquests productes en llet és de 4 $\mu\text{g}/\text{L}$, molt lluny del que el nostre assaig podia detectar. Quelcom no estava funcionant i per tant, és en aquest punt on ens vam plantejar trobar una explicació a la manca de detectabilitat. Fent recerca bibliogràfica vam observar que molts altres autors tenien detectabilitats similars a les nostres (apartat 1.6.7.5.).

D'altra banda, es ben coneguda la facilitat de les penicil·lines per hidrolitzar-se, especialment en medis bàsics. I es per aquest motiu que es va decidir assajar l'àcid amoxiciloic com a analit, o dit d'una altra manera, la forma oberta de l'amoxicil·lina (amb l'anell β -lactàmic hidrolitzat).

La forma oberta de l'amoxicil·lina es va obtenir d'una forma molt senzilla, tractant l'amoxicil·lina en medi aquós alcalí seguit d'una purificació per HPLC. La seva estructura es va caracteritzar tant per espectrometria de masses com per ressonància magnètica nuclear. Els resultats obtinguts dels assaigs amb aquests compostos estan descrits en la **Taula 4.6.** i a la **Figura 4.9.** Els primers assaigs de competència que es van fer amb el competidor PenV1-AD i l'As218 presenten una EC_{50} al voltant de 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ demostrant que l'anticòs és específic per la β -lactama hidrolitzada. Això podria ser degut a dues causes, o l'immunogen es hidrolitzar en l'etapa de conjugació entre l'haptè i la proteïna, o dins l'animal hoste, un cop immunitzat.

Taula 4.6. Corba d'inhibició per a l'àcid amoxiciloic.	
Anticòs	As218
Antigen	PenV1-AD
Analit	Àcid amoxiciloic
A_{max}	1.081
A_{min}	0.1146
m	-1.004
EC_{50} (nM)	3.062
EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{L}$)	1.12
R^2	0.9981

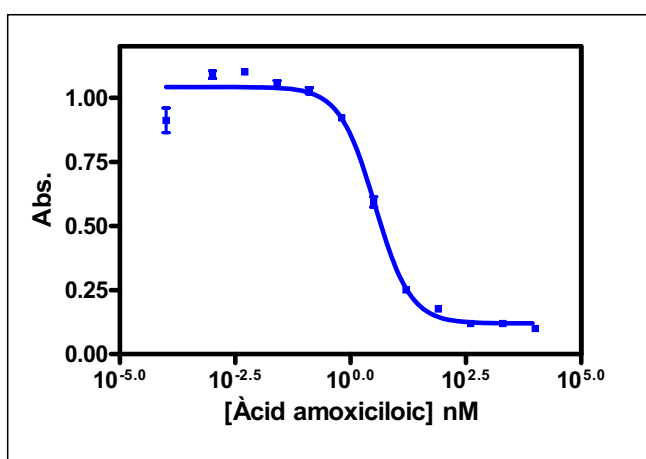


Figura 4.9. Corba d'inhibició per a l'àcid amoxiciloic.

4.5.2. Resum i conclusions de la producció d'anticossos policlonals

Durant aquesta primera part del capítol s'ha aconseguit:

- Generar uns anticossos policlonals que reconeixen un ampli nombre d'antígens, concretament els antisèrums 218 i 219 són els que donen millors resultats i per tant els que s'han emprat en la gran majoria d'assaigs competitius.
- S'han realitzat molts assaigs competitius i només en utilitzar la forma oberta de l'amoxicil·lina s'ha observat una bona detectabilitat.

En base a aquets resultats, la doctoranda Marta Broto ha continuat aquesta línia de treball i actualment ja es disposa d'un assaig per analitzar β -lactames en llet amb molt bona detectabilitat, on l'estratègia consisteix en hidrolitzar prèviament les penicil·lines amb la β -lactamasa unida a partícules magnètiques. En la **Taula 4.7.** i en la **Figura 4.10.** s'observa la corba d'inhibició optimitzada amb una EC_{50} de 0.35 $\mu\text{g/L}$.

Taula 4.7. Corba d'inhibició per a l'àcid amoxiciloic.	
Anticòs	As218
Antigen	PenG1-AD
Analit	Àcid amoxiciloic
A_{max}	0.9825
A_{min}	0.08517
M	-0.9949
EC_{50} (nM)	0.9675
EC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	0.35
R^2	0.9995

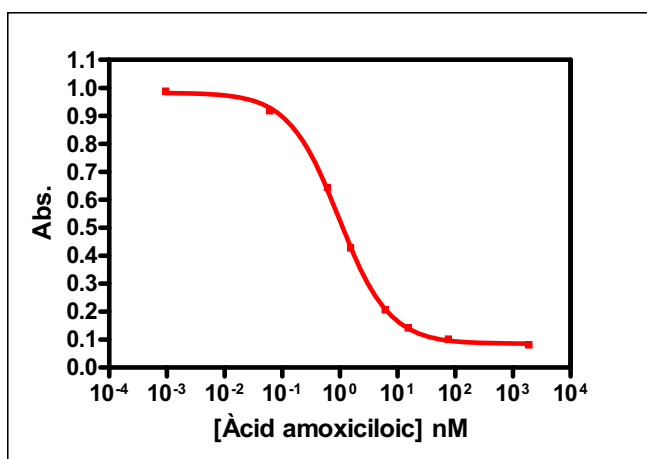


Figura 4.10. Corba d'inhibició per a l'àcid amoxiciloic.

4.6. Producció d'anticossos monoclonals

Basant-nos en els resultats obtinguts anteriorment, es va decidir produir anticossos monoclonals per millorar l'assaig de detecció de penicil·lines. Els avantatges i desavantatges han estat descrits anteriorment, però es important recordar alguns d'ells en el present apartat. La producció d'anticossos monoclonals és una feina laboriosa i costosa. Les cèl·lules necessiten estar constantment controlades durant el seu creixement, una petita contaminació o un canvi de temperatura poden produir la seva mort ràpidament. No obstant, valia la pena intentar

seleccionar un clon que realment fos específic contra l'estructura β -lactàmica comú a totes les penicil·lines.

4.6.1. Procés d'immunització

En aquest cas es van utilitzar ratolins Balb/C. La raó d'utilitzar ratolins és que comercialment existeixen línees de mieloma estables que mitjançant protocols ben establerts s'obtenen fusions reproduïbles amb els limfòcits dels ratolins. Tot i que actualment s'està treballant amb altres línees cel·lulars de mieloma, fins el moment hi ha hagut pocs resultats positius quan aquests es fusionen amb limfòcits d'altres animals com conills, cabres,...

El primer cas alhora de fer un anticòs monoclonal és immunitzar els ratolins. Es va escollir l'immunogen Amx2-Mp-HCH (**Figura 4.11.**). Aquest conjugat en teoria deixa exposat l'anell β -lactàmic pel reconeixement del anticòssos.

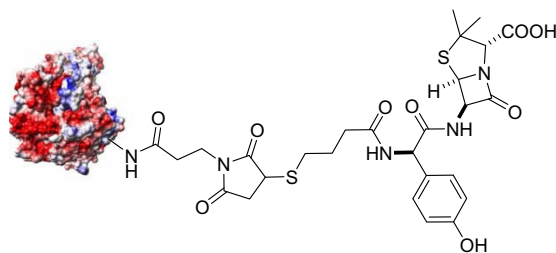


Figura 4.11. Estructura de l'Amx2-Mp-HCH.

4.6.2. Extracció de sangs parcials i títols

Abans de començar el procés per la producció dels anticòssos monoclonals, es va comprovar que el títol d'anticòssos en els sèrums dels ratolins fos alt. Es van extraure mostres de sang abans de les immunitzacions, dues setmanes després de la tercera injecció i el mateix dia de l'extracció de la melsa. Amb aquestes sangs policlonals es van fer assajos no competitius per comprovar que els anticòssos reconeixien els conjugats β -lactàmics. Els resultats dels ELISAs, utilitzant com a antigen l'Amx2-M-BSA, es poden veure a la **Figura 4.12.** En aquest cas, la dilució d'anticòs escollida va ser de 1/2000 i la concentració d'antigen 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

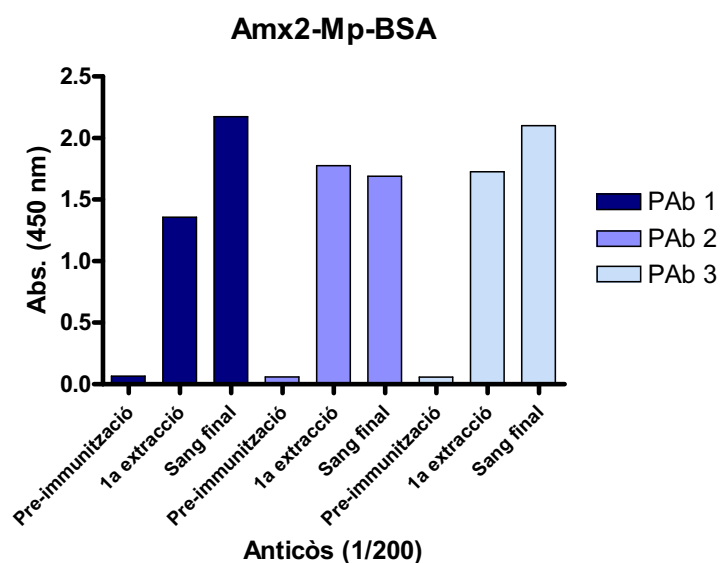


Figura 4.12. Estudi del títol d'anticossos policlonals de ratolí utilitzant l'antigen Amx2-M-BSA.

Figura 4.8. Títols finals dels anticossos policlonals de ratolí.

Antigen (1 µg/mL)	Anticòs (1/2000)		
	PAb 1	PAb 2	PAb 2
Amx1-AD	1.2	0.2	0.2
Amp1-AD	0.3	0.1	0.3
PenG1-AD	0.1	0.1	0.1
PenV1-AD	0.1	0.1	0.1
Amx2-Mp-BSA	2.2	1.7	2.1
Amx2-Mp-AD	2.1	1.2	1.7
Amx2-I-BSA	1.8	1.1	1.8
Amp2-Mp-BSA	2.2	1.3	2.2
Amp2-Mp-AD	1.9	0.7	2.1
Amx2-I-BSA	1.7	1.0	1.7
Amx3-I-BSA	0.9	0.2	0.3

	0-0.5
	0.5-1
	1-1.5
	1.5-2
	2-2.5

Paral·lelament, amb les sangs finals obtingudes, es van realitzar una sèrie d'ELISAs no competitiu, utilitzant diferents antigens, per tal de determinar quin era el millor d'ells per realitzar el posterior cribratge d'hibridomes (veure **Taula 4.8.**). Com es pot observar, el ratolí 2 té una resposta molt més baixa que els altres dos ratolins davant tots els antigens, així doncs els ratolins 1 i 3 van ser els escollits per a realitzar la fusió. L'antigen Amp2-Mp-BSA (**Figura 4.13.**) va ser l'escollit tant per l'alt títol que tenia com per què era heteròleg respecte l'immunogen. Tot i que no està demostrat, empíricament s'ha comprovat moltes vegades que l'heterologia afecta al reconeixement i especificitat dels anticossos. Es parla d'heterologia quan hi ha diferències estructurals entre l'immunogen i l'antigen. Utilitzar el mateix compost

es considera treballar en condicions d'homologia. Aquest fenomen es va observar clarament en el cas anterior amb els anticossos policlonals de conill, on la millor combinació Ag/As es va obtenir en condicions d'elevada heterologia.

En aquest cas, l'heterologia va ser baixa, només es va canviar la unió del braç espaciador a la proteïna i el grup fenol pel grup fenil.

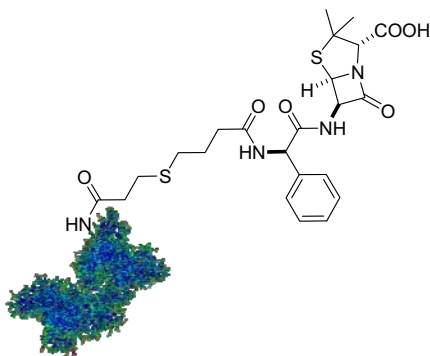


Figura 4.13. Estructura de l'antigen Amp2-I-BSA.

Com en el cas dels anticossos de conill, la major afinitat va ser pels antígens de grup 2 i les pitjors respostes varen ser per els antígens PenG1-AD i PenV1-AD.

4.7. Avaluació dels anticossos monoclonals

4.7.1. Fusió

El primer pas consisteix en fusionar els limfòcits B de la melsa dels ratolins amb cèl·lules de mieloma. Els ratolins 1 i 3 van ser escollits per a dur a terme la fusió. La metodologia emprada es descriu a l'apartat de materials i mètodes. En el cas del ratolí 1, es van utilitzar 5 microplaques de 96 pous per cultivar les cèl·lules fusionades (170 000 limfòcits/pou), mentre que en el cas del ratolí 3 es van utilitzar 4 plaques (150 000 limfòcits/pou).

La fusió cel·lular es un dels passos claus en la producció d'anticossos monoclonals. Les cèl·lules fusionades obtingudes reben el nom de hibridomes, cèl·lules immortals amb capacitat per produir anticossos. Es va utilitzar un medi de HAT (hipoxantin-aminopterín-timidina) per portar a terme la fusió cel·lular, ja que el HAT bloqueja la via *de novo* de síntesis de DNA, i això fa que les cèl·lules de mieloma que no s'han fusionat morin degut a que no poden generar nucleòtids. D'altra banda, les cèl·lules B de melsa no fusionades també moren a causa de la seva curta vida. Així doncs, finalment només sobreviuen les cèl·lules fusionades o hibridomes.

4.7.2. Cartografia dels clons

Les cèl·lules fusionades es van cultivar en 9 microplaques de 96 pous cadascuna. Abans de fer el cribatge, cada pou va ser visualitzat per microscopi per veure el creixement dels clons. Un exemple d'aquestes cartografies dels clons es pot veure a l'Annex 3 (Placa 1, ratolí 1). Els clons es van poder contabilitzar ja que formaven una agrupació de cèl·lules de forma circular. També es van observar cèl·lules creixent individualment. Com es pot observar en el mapa, cada pou podia contenir més d'un clon.

La cartografia dels clons és important per poder detectar falsos positius en els assaigs posteriors. És a dir, permet detectar en quins pous hi ha clons, independentment dels resultats obtinguts en els assaigs de cribatge. A la **Figura 4.14.** es pot veure una imatge real d'una colònia d'hibridomes.



Figura 4.14. Colònia formada pels clons d'hibridoma.

4.7.3. Primer cribatge

Un cop fusionades les cèl·lules i separats els hibridomes, aquests es van deixar créixer i posteriorment es van analitzar els anticossos produïts i localitzats en el sobrenedant del medi de cultiu en el que es trobaven per determinar quins clons eren els millors. El primer cribatge es va portar a terme 12 dies després de la fusió, temps suficient per a que les cèl·lules creixessin. Utilitzant els immunoreactius seleccionats anteriorment es va fer un assaig competitiu d'inhibició a una concentració fixa d'analit (200 nM), en aquest cas amoxicil·lina. Els resultats es poden observar en la **Taula 4.9.** El percentatge d'inhibició dels clons escollits es

pot veure en la **Taula 4.10.** i **Taula 4.11.**. Del ratolí 3 es van escollir 3 pous, mentre que es van seleccionar 24 pous en el cas del ratolí 1. Els clons seleccionats van ser transferits a plaques de 24 pous i es va afegir més medi de cultiu.

Taula 4.9. Resultats del cribatge de MABs.		
	Ratolí 1	Ratolí 3
Núm. de plaques	5	4
Núm. de possible clons	(5x96) >480	(4x96) >384
Núm. de clons que mostren una certa inhibició	230	96
Núm. de clons que mostren més del 10 % d'inhibició	29	78
Núm. de pous amb més clons	24	5

Taula 4.10. Percentatges d'inhibició dels clons del ratolí 1 en el primer cribatge.					
Placa	Posició de la placa	% Inhibició	Placa	Posició de la placa	% Inhibició
1	6B	8.9	3	4C	6.9
	7F	6.59		7B	25.96
2	1E	7.5	4	6G	16.78
	4C	7.7		7E	7.08
	5F	17.2		8A	4.8
	7H	9.48		9D	8.6
	10B	15.35		9E	16.59
	10C	8.5		11B	8.3
3	10A	26.1	5	1E	9.39
	1C	12.7		1F	10.08
	2C	9.8		2G	10.28
	2A	11.39		9D	13.48

Taula 4.11. Percentatge d'inhibició dels clons del ratolí 3 en el primer cribatge.		
Placa	Posició de la placa	% Inhibició
2	11C	70.54
	11D	65.96
3	12E	54.77
4	5D	72.79
	5F	56.8

4.7.4. Segon cribatge dels clons del ratolí 1

Els resultats obtinguts del ratolí 1 no van ser bons. L'amoxicil·lina pràcticament no inhibia la interacció antígen/anticòs. Per aquesta raó, es va portar a terme un segon cribatge de les cèl·lules fusionades del ratolí 1. En aquest cas l'antigen es va canviar pel Amx1-AD, per incrementar l'heterologia de l'assaig. Per afavorir encara més el reconeixement de l'amoxicil·lina, es va augmentar la concentració d'aquesta fins a 1 μ M. En aquest segon cribatge, es van obtenir 130 pous (clons) que presentaven una inhibició major del 10%, però només 14 d'ells mostraven una inhibició major del 20%. En total, 34 pous van ser escollits per continuar amb la investigació. Aquests clons van ser escollits no només per la inhibició que presentaven, sinó també per la seva absorbància i per l'aspecte en la seva cartografia. Molts dels que presentaven inhibició tenien absorbàncies molt baixes o no mostraven colònies consistents d'hibridomes.

4.7.5. Segon cribatge dels clons del ratolí 3

Bàsicament es va fer el mateix procés que abans. Es va afegir més medi de cultiu, es va deixar que els hibridomes creixessin i es van tornar a assajar els sobrenedants. En aquest cas, cap clon va mostrar inhibició a l'amoxicil·lina. Finalment es van desestimar els clons del ratolí 1.

4.7.6. Clonació dels hibridomes del ratolí 3

La clonació consisteix en contar el número de cèl·lules de cadascun dels pous, separar-les a unes concentracions concretes en altres microplaques de 96 pous i fer-les créixer de nou. Els pous escollits del ratolí 3 es van transferir a una placa de 24 pous amb més medi de cultiu. Les cèl·lules es van clonar transferint 100 μ L de cada clon en cadascun dels 96 pous d'una altra placa. D'aquesta manera s'intenta separar al màxim tots els hibridomes fent que en cada pou només hi quedi una única línia cel·lular. Les cèl·lules dels clons 2.1 (11C), 3.1 (12E) i 4.1(5D) van ser incubades de nou (veure **Taula 4.11.**), i després de 9 dies van estar preparades per un nou cribatge. Les altres dos 2.2 (11D) i 4.2 (5F) no havien crescut tant com les anteriors, però de totes maneres es van assajar per veure la seva evolució. Malauradament, tampoc es va veure inhibició de l'amoxicil·lina i finalment vàrem abandonar aquesta línia de producció d'anticossos.

4.8. Resum i conclusions de la producció d'anticossos monoclonals

Els resultats obtinguts de la producció d'anticossos monoclonals van ser decebedors. Tot i obtenir resposta dels anticossos policlonals de ratolí (**Figura 4.12.**), no es va poder aïllar cap clon productor d'anticossos específics contra amoxicil·lina. Una altra vegada més ens varem trobar amb la impossibilitat de genera anticossos contra amoxicil·lina en forma tancada.

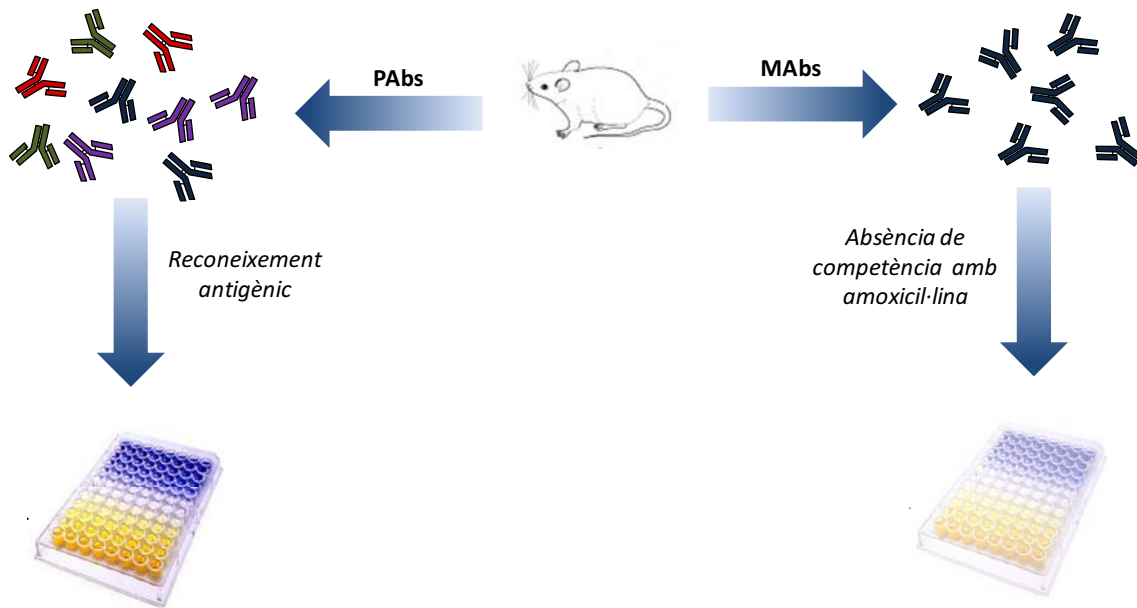


Figura 4.15. Resum esquemàtic dels resultats obtinguts en la producció de MAbs contra amoxicil·lina.

5. Diagnòstic d'al·lèrgies a penicil·lines mitjançant la detecció d'IgEs específiques

5.1. Introducció

La detecció d'IgEs específiques per a penicil·lines és l'objectiu principal d'aquest capítol. Les al·lèrgies a fàrmacs β -lactàmics majoritàriament són de resposta immediata i per tant, es classifiquen dintre de les hipersensibilitats de tipus I, o dit d'una altra manera, mediades per IgEs. Un cop aquests anticossos reconeixen l'analit, la seva funció és activar els basòfils i els masòfils i així, activar de manera immediata la resposta immune. Per tant, mentre més gran sigui la població d'IgEs específiques contra l'al·lèrgen que produeix l'al·lèrgia, menys quantitat d'al·lèrgen serà necessari per desencadenar la reacció al·lèrgica [208].

Normalment, les IgEs es troben a una concentració molt baixa en sèrum, entre 0.1-1 $\mu\text{g/mL}$ i s'estima que la població d'IgEs específiques és 10 vegades més petita. Ja s'ha comentat anteriorment els problemes associats a la detecció actual d'al·lèrgies a penicil·lines utilitzant mètodes in vitro. En general, són metodologies poc fiables i/o poc específiques. Els al·lèrgens que utilitzats en aquests mètodes són molt limitats, ja que principalment només s'utilitza el determinant majoritari unit a PLL. Tenint ben present la problemàtica entorn aquest tema, en aquest capítol es pretén desenvolupar un sistema de diagnòstic per detectar IgEs específiques contra fàrmacs penicil·línics mitjançant l'ús dels adductes amoxicil·línics descrits en el capítol 2 i els antígens descrits en el capítol 3. El repte encara es va complicar més pel fet que no es podia treballar ni amb mostres estàndard ni amb models animals. Les al·lèrgies dels animals són diferents de la dels humans, i mai s'ha descrit cap animal al·lèrgic a β -lactàmes. Per tal de poder desenvolupar aquests assaigs, la Unitat d'Al·lèrgologia de l'Hospital de Bellvitge ens va facilitar 15 mostres de sèrum provinents de pacients al·lèrgics a penicil·lines (es descriuen a l'Annex 6). A continuació es descriuen tots els assaigs de tipus ELISA i microarray que es van portar a terme per poder assolir aquest gran objectiu.

5.2. Assaigs tipus ELISA

Inicialment es van fer els estudis de validació dels conjugats i avaluació dels sèrums mitjançant assaigs tipus ELISA. Es va escollir l'ELISA perquè permetia de manera senzilla optimitzar diversos paràmetres simultàniament fins a assolir les millors condicions d'assaig, utilitzant volums petits de mostra. Hem de recordar que tots els assaigs es van fer amb sèrums de pacients al·lèrgics, i es disposava de poc volum de mostra. Per tant, es van avaluar tots els adductes penicil·línics (descrits a l'apartat 2.2.3.) (Annex 4) i tots els antígens (Annex 5) , i es van optimitzar les condicions d'assaigs com la concentració dels immunoreactius, la duració de cada etapa de l'immunoassaig, la temperatura, etc.

A continuació es descriuen els assaigs de validació, optimització i avaluació dels sèrums específics que es van dur a terme utilitzant aquest format d'ELISA.

5.2.1. Validació dels adductes

Els adductes penicil·línics sintetitzats van ser validats utilitzant una IgG contra amoxicil·lina adquirida comercialment. En aquest moment encara no disposàvem dels nostres propis anticossos. El primer assaig que es va realitzar va ser de tipus indirecte. Es va immobilitzar estreptavidina s'obre una microplaca. Cal recordar que els adductes contienien una biotina en la seva estructura, grup molt afí i específic per la proteïna estreptavidina. Seguidament es van afegir els adductes a concentracions entre 0.25 μM i 1 μM i tot seguit la IgG anti-amoxicil·lina comercial. Finalment es va afegir l'anticòs secundari unit al traçador enzimàtic, en aquest cas HRP (**Figura 5.1.**), per poder catalitzar la resposta colorimètrica.

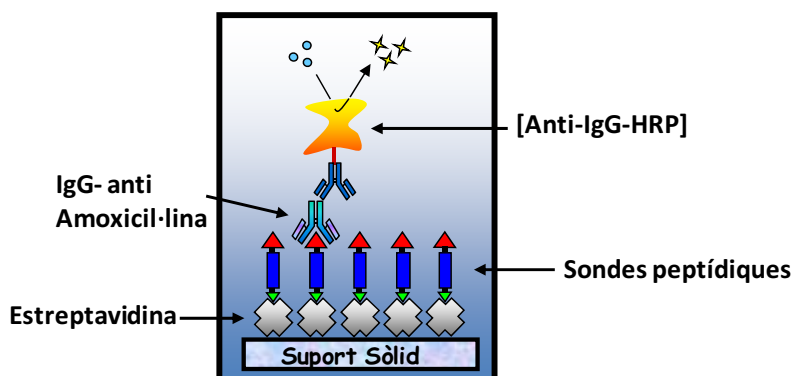


Figura 5.1. Format indirecte per a validar els adductes penicil·línics.

Utilitzant aquest format d'assaig no es va obtenir cap resposta amb cap dels adductes utilitzats. Es possible que l'adducte, en unir-se a l'estreptavidina, quedés plegat dins la seva estructura proteica impedit l'accessibilitat de les IgG anti amoxicil·lina. També es va provar l'assaig en format directe. En aquest cas es va immobilitzar l'anticòs anti-amoxicil·lina a la superfície de la placa. Seguidament es van afegir els adductes a concentracions entre 50 nM-1 µM i finalment es va afegir l'estreptavidina unida a HRP (**Figura 5.2.**).

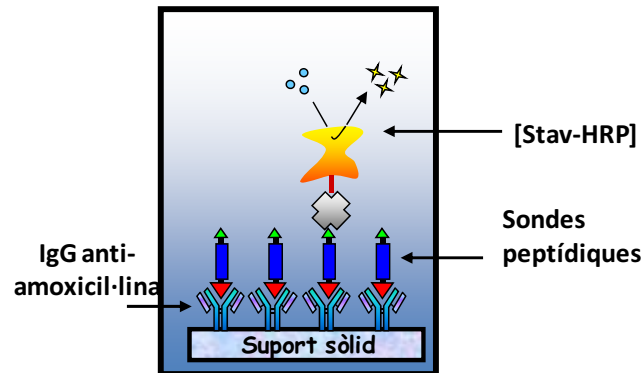


Figura 5.2. Format directe per a validar els adductes penicil·línics.

En aquest cas sí que es va obtenir una resposta colorimètrica positiva. Tal com s'observa a la **Figura 5.3.**, amb més o menys intensitat tots els adductes donaven resposta, mentre que les sondes peptídiques inicials, sense els fragments β-lactàmics, eren pràcticament negatives.

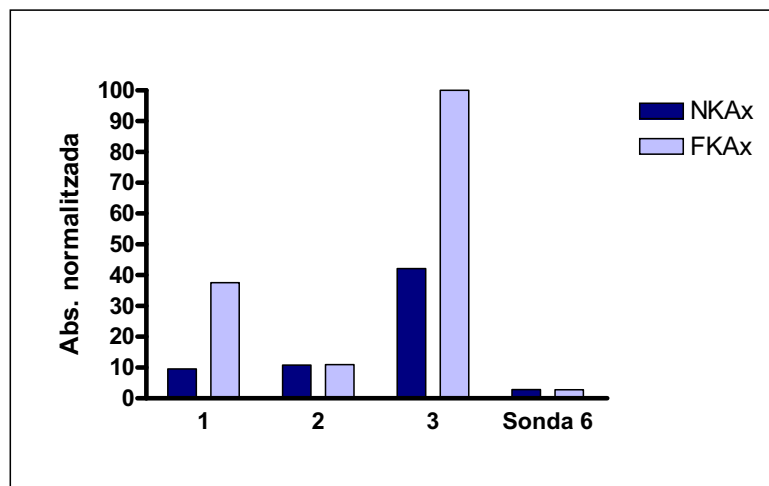


Figura 5.3. Validació dels adductes NKAx i FKAx utilitzant una IgG anti-amoxicil·lina.

La resposta era diferent per a cadascun d'ells confirmant la seva diferència estructural. Aquest primer assaig de validació es va fer a una concentració d'adductes de 50 nM,

principalment perquè en el cas dels adductes FKAx1, FKAx2 i FKAx3, la quantitat de la que es disposava era molt baixa. No obstant, això va ser suficient per comprovar que veritablement tant els adductes obtinguts amb la sonda peptídica **6** com els obtinguts amb la sonda peptídica **7** s'unien específicament a anticossos dissenyats per reconèixer la forma oberta de l'amoxicil·lina.

Per tal de confirmar aquests resultats es van tornar a repetir els assaigs de validació però utilitzant concentracions més elevades dels adductes NKAx. En aquest cas, es va afegir un altre blanc corresponent a l'absència de l'adducte i de la sonda peptídica (**Figura 5.4.**).

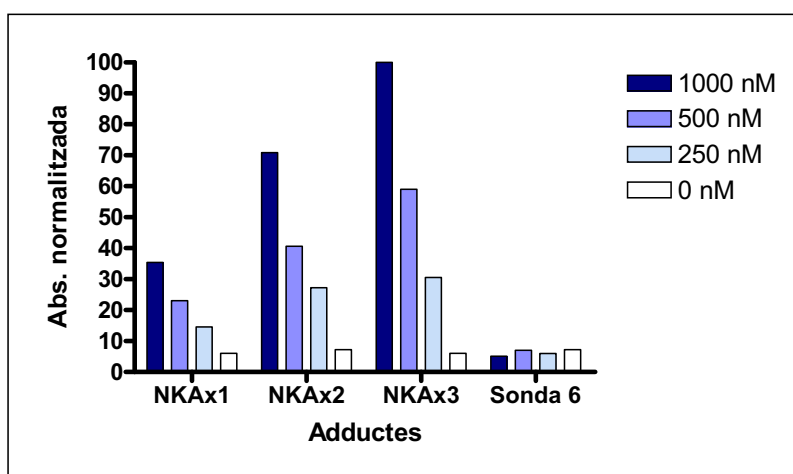


Figura 5.4. Validació dels adductes NKAx utilitzant una IgG anti-amoxicil·lina.

Novament es va poder comprovar que l'assaig era específic per als adductes derivats de l'amoxicil·lina i no hi havia resposta inespecífica per part de les sondes. Amb aquests resultats, i tenint en compte que es disposava de més quantitat dels adductes NKAx1, NKAx2 i NKAx3, es va decidir prosseguir la resta d'assaigs amb aquests compostos.

5.2.2. Avaluació de les mostres de pacients al·lèrgics a penicil·lines

Com s'ha comentat anteriorment, gràcies a la col·laboració amb el Departament d'Al·lergologia de l'Hospital de Bellvitge, es va poder disposar d'una sèrie de mostres de sèrum humà provinents de donacions anònimes de pacients al·lèrgics a penicil·lines, els quals havien patit reaccions al·lèrgiques uns mesos abans de cedir les mostres de sang. Es van obtenir 15 mostres de 15 pacients diferents. Cadascuna de les mostres tenia el següent historial clínic (Annex 6). En l'Annex 7 s'inclou la documentació necessària referent al consentiment dels pacients per poder utilitzar les seves mostres de sèrum.

Una dificultat afegida al projecte va ser disposar de sèrums blancs, és a dir, de sèrums sense IgE específiques a penicil·lines. No és estrany que percentatges molt elevats de la població tinguin anticossos IgG anti-penicil·lines al sèrum. La raó és evident, tothom a pres aquests fàrmacs des de ben petits. I tampoc seria estrany pensar que aquesta mateixa població tingués anticossos IgE contra aquests mateixos fàrmacs, tot i que a unes concentracions suficientment baixes com per no desencadenar una resposta al·lèrgica detectable.

Per tant, es va decidir treballar amb una barreja de sèrums i plasmes, provinents en aquest cas de donacions del banc de sang de la Vall d'Hebrón, els quals es van considerar blancs en totes les proves realitzades. Es va suposar que si algun d'ells era al·lèrgic a les penicil·lines quedaria diluït amb la resta de sèrums.

Com es pot observar en els historials clínics, tan sols 3 dels 15 sèrums provinents de pacients al·lèrgics a amoxicil·lina han presentat IgEs específiques a aquest fàrmac en els test *in vitro* duts a terme a l'Hospital, demostrant la falta de sensibilitat que aquests test tenen en l'actualitat. Amb aquestes mostres de sang es van començar a realitzar els primers assaigs per a detectar IgEs específiques contra amoxicil·lina.

a. Assaigs amb els adductes amoxicil·línics NKAx

El format d'assaig era molt similar a l'anterior. En aquest cas es va utilitzar un anticòs comercial anti-IgE que s'immobilitzava sobre la placa, i era aquest el que atrapava les IgE dels sèrums dels pacients. A continuació s'afegien els adductes amoxicil·línics NKAx i finalment l'estreptavidina-HRP (Figura 5.5).

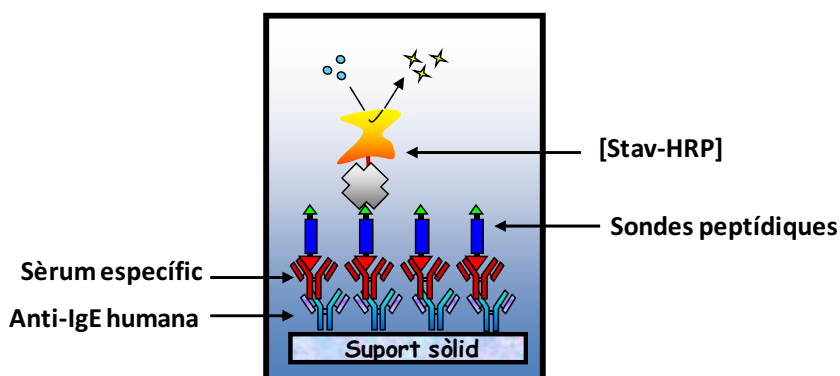


Figura 5.5. Representació del format d'immunoassaig utilitzat en mostres de pacients al·lèrgics.

Les concentracions dels immunoreactius emprades van ser seleccionades a partir dels experiments de validació dels adductes descrits a l'apartat anterior. Aquest assaig es va fer

variant diferents paràmetres com la concentració d'antilgE, els temps i la temperatura d'incubació i les dilucions dels sèrums. Cal recordar que les concentracions de IgE en sèrum són molt baixes. Era important treballar amb els sèrums concentrats, evitant així diluir massa aquestes immunoglobulines. En cap cas es va observar un reconeixement específic clar de cap dels sèrums, ja que sempre s'obtenia un efecte matriu molt elevat. En la **Figura 5.6.** s'observa com l'adducte NKAx1 i sonda peptídica **6** generen una resposta positiva en presència de sèrum específic (barreja de sis sèrums provinents de pacients al·lèrgics) i sèrum no específic. D'altra banda, el senyal no específic de l'adducte NKAx1 és més alt que el de la sonda peptídica, demostrant que el soroll de fons d'aquest assaig possiblement està generat tant per les mostres de sèrum com pels adductes penicil·línics.

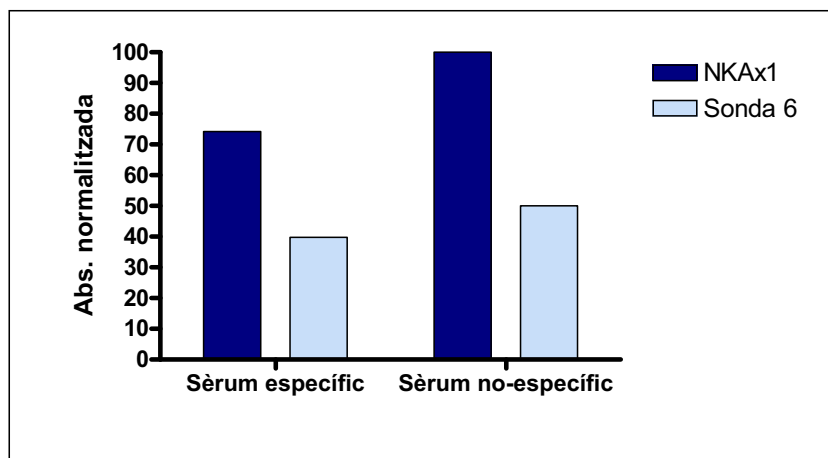


Figura 5.6. Resposta de l'adducte NKAx1 i la sonda peptídica **6** davant de diferents mostres de sèrums específics i no específics.

Per intentar disminuir aquest soroll de fons, es va intentar purificar el sèrum mitjançant la precipitació d'immunoglobulines i columnes d'immunoafinitat (veure apartat 7.2.7.3.6.). Normalment, al augmentar la força iònica del sèrum, les proteïnes més pesades com les immunoglobulines precipiten. D'aquesta manera s'obté una purificació parcial del sèrum. Una altra estratègia de purificació és mitjançant l'ús de columnes d'immunoafinitat. En aquest cas, s'immobilitzen en el rebliment d'una columna immunoglobulines anti-IgE, les quals atrapen exclusivament les IgE del sèrum. Aquesta unió és reversible a canvis en la força iònica o el pH, els quals són els paràmetres que es varien per desadsorbir les IgE de la columna. Val a dir que, en general, les recuperacions mitjançant aquesta tècnica són molt dolentes, i més quan estem parlant de concentracions tan baixes com és el cas de les IgEs. Cap d'aquestes solucions va aconseguir reduir el soroll de fons suficientment com per poder observar una resposta específica.

b. Assaigs amb els antígens amoxicil·línics

Com en el cas anterior, també es varen avaluar els sèrums de pacients al·lèrgics però utilitzant els antígens d'amoxicil·lina preparats anteriorment (apartat 3.5., Annex 5).

L'assaig que es va realitzar va ser de tipus indirecte. A la **Figura 5.7.** s'observa un esquema representatiu d'aquest. L'assaig va consistir en immobilitzar els corresponents antígens sobre el suport sòlid, seguidament es va afegir la mostra de sèrum sense diluir i finalment una anti-IgE-HRP. Prèviament s'havien validat els diferents antígens mitjançant assaigs amb IgG de conill específiques a l'amoxicil·lina (Capítol 4). Es van triar tres antígens per fer aquest experiments (Amx1-AD, Amx2-Mp-BSA i Amx3-I-BSA). Els resultats es poden observar a la **Figura 5.8.** Només en el cas del sèrum 7 es va poder afirmar que presentava una resposta positiva per tots tres antígens. Cal recordar que tots els antígens reconeixen l'estructura de l'amoxicil·lina en la seva forma oberta.

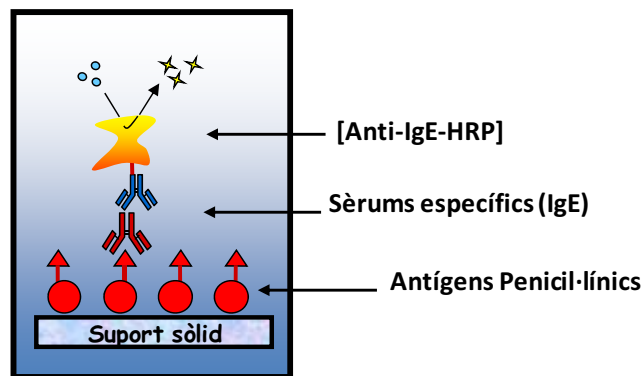


Figura 5.7. Esquema del format d'immunoassaig utilitzat per l'avaluació de sèrums amb els antígens d'amoxicil·lina.

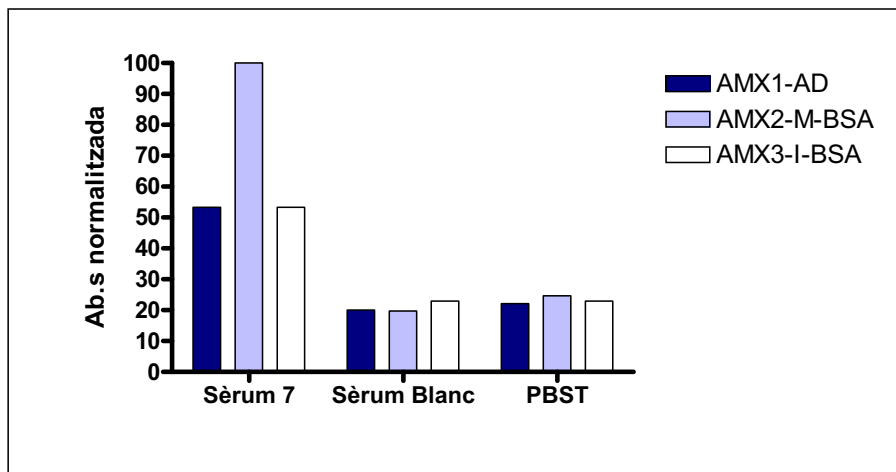


Figura 5.8. Avaluació del sèrum 7 amb els antígens AMX1-AD, AMX2-Mp-BSA i AMX3-I-BSA.

5.3. Assaigs tipus magneto-ELISA per l'avaluació dels sèrums específics amb els adductes NKAx

Els resultats utilitzant els adductes varen ser molt decebedors principalment pel gran efecte matriu que tenien. Si és volia eliminar aquest efecte matriu s'havia de diluir tant la mostra que llavors l'assaig no era suficientment sensible. Per solventar aquest problema es va desenvolupar un magneto-ELISA. Aquest assaig consisteix en l'ús de partícules magnètiques com a suport sòlid. Aquestes, a més de concentrar la mostra, permeten separar les molècules d'interès dels sèrums mitjançant un camp magnètic. Aquestes partícules poden ser de mides molt diverses i estar recobertes amb diversos agents, però per tal que sigui magnètica cal que estiguin fetes d'un nucli de ferrita. Per aquests assaigs es van utilitzar partícules de ferrita superparamagnètiques d'un micròmetre de diàmetre recobertes d'un polímer de poliestirè i funcionalitzades amb un grup tosil. Aquesta funcionalització permet unir anticossos o altres proteïnes covalentment a través dels seus grups amino lliures.

Treballant amb partícules magnètiques es podien fer etapes de neteja d'una manera més efectiva, i fins i tot es podia canviar el recipient de l'assaig evitant així l'adsorció inespecífica.

5.3.1. Preparació de les partícules magnètiques

El primer pas consisteix en la unió de l'anti-IgE a les partícules. En aquest estudi es van conjuguar a 3 anticossos diferents. Dos d'ells van ser utilitzats per a validar els adductes en aquest nou format mentre que amb l'altre es van realitzar els assaigs de detecció de IgEs específiques contra amoxicil·lina en els sèrums.

Els dos anticossos utilitzats per validar els adductes van ser una anti-IgG de ratolí i una anti-IgG de conill. La primera atraparà les IgG anti-amoxicil·lina comprades comercialment, mentre que la segona interaccionarà amb les IgG produïdes durant aquesta Tesi (As218) i descrites anteriorment a l'apartat 4.2.. El grau de conjugació que es va obtenir en cada cas va ser del 97% i 100%, respectivament. Aquest es va mesurar calculant la concentració final d'immunoglobulines al sobrenedant de la reacció d'acoblament. El protocol de conjugació es descriu a l'apartat 7.2.7.2.1..

L'anticòs que es va unir a les partícules magnètiques per a realitzar els assaigs de detecció d'IgEs específiques en sèrums va ser una anti-IgE humana adquirida comercialment. El grau de conjugació en aquest cas va ser del 87%.

5.3.2. Validació dels adductes

Tal i com s'explica a l'apartat anterior, per fer la validació dels adductes es van utilitzar les partícules conjugades a anti-IgG i es va seguir el format d'assaig representat a la **Figura 5.9**.

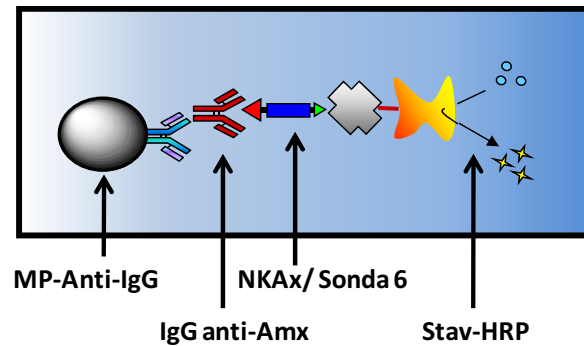


Figura 5.9. Format de l'assaig Magneto-ELISA emprat per validar els adductes NKAx.

En una primera etapa, s'estableix la interacció entre l'anticòs unit a la partícula i l'anticòs anti-amoxicil·lina, tot seguit s'addicionen els adductes i el pèptid 6 com a blanc, i finalment l'enzim unit a l'estreptavidina (Stav-HRP). A la **Figura 5.10**, s'observen els resultats obtinguts de la validació dels adductes utilitzant la IgG anti-amoxicil·lina adquirida comercialment.

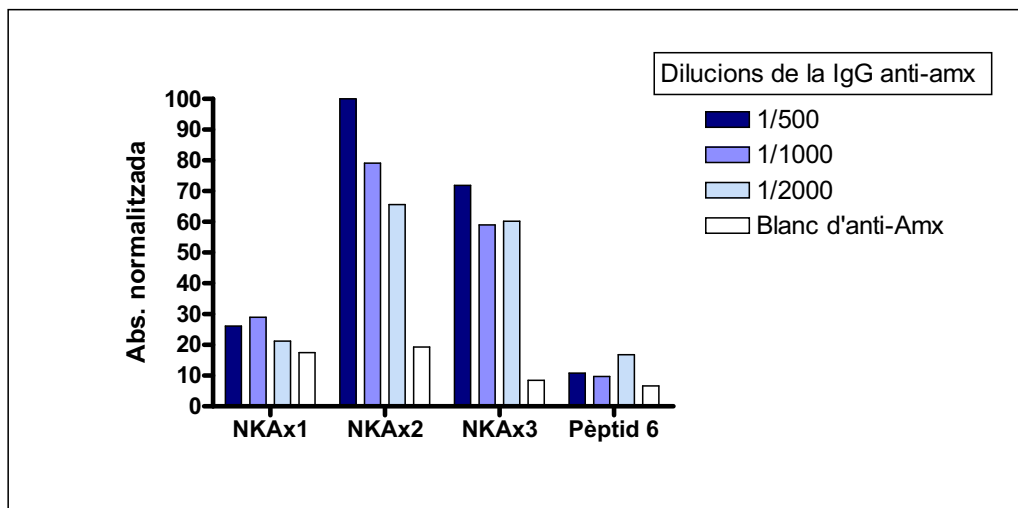


Figura 5.10. Validació dels adductes NKAx utilitzant la IgG anti-amx adquirida comercialment.

Com es pot observar els adductes NKAx2 i NKAx3 van ser els més reconeguts, similars als resultats obtinguts en el format d'assaig sobre microplaca. En canvi, en utilitzar l'As 218 per realitzar aquest assaig, es va observar una resposta molt més gran per part de tots

els adductes, especialment de l'adducte NKAx1 (**Figura 5.11.**), el qual va saturar el senyal a dilucions altes d'anticòs.

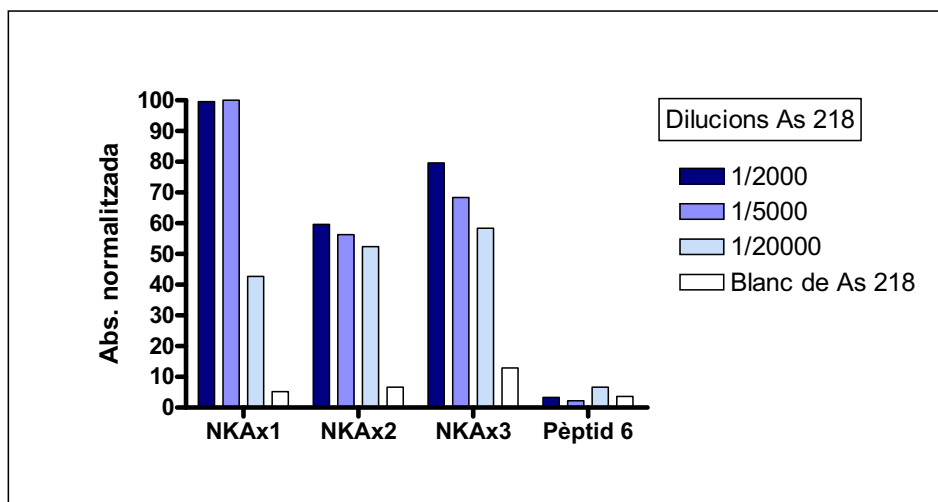


Figura 5.11. Validació dels adductes NKAx utilitzant la IgG anti-amx (As218).

5.3.3. Optimització de les condicions d'assaig mitjançant sèrums no específics (Blancs)

A continuació es varen optimitzar les condicions del magneto-ELISA amb mostres de sèrums no específics (blancs), per tal d'obtenir la mínima resposta possible utilitzant la màxima quantitat de sèrum, és a dir, evitar al màxim la dilució de les IgEs presents.

Per aquesta optimització, es van estudiar factors com la concentració de detergent (Tween 20) en l'etapa d'addició de l'adducte, l'addició de PEG o EtOH, i la variació del temps i la temperatura en l'etapa de preincubació del sèrum amb les partícules magnètiques. De tots aquests paràmetres fisico-químics estudiats el que va resultar més efectiu per a la reducció del soroll de fons va ser el canvi de continent just abans d'addicionar el substrat. Així doncs, quedava demostrat que el sèrum interferia en l'assaig degut a que parcialment quedaven substàncies adsorbides a les parets dels recipients que s'utilitzaven per desenvolupar l'assaig.

5.3.4. Avaluació de mostres de pacients al·lèrgics a penicil·lines

El format final d'assaig es descriu a continuació. Una representació d'aquest es pot veure a la **Figura 5.12.**

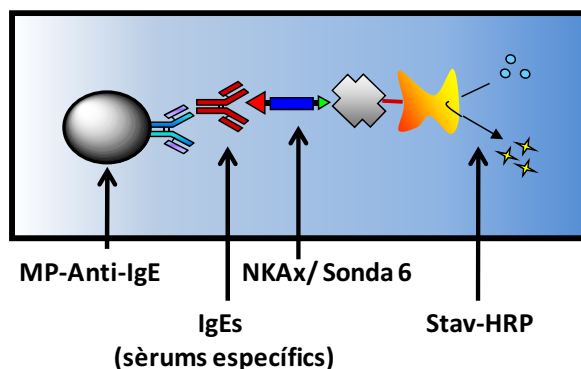


Figura 5.12. Format de l'assaig Magneto-ELISA usats en l'avaluació dels sèrums específics.

Per aquest assaig, les partícules es trobaven conjugades a anti-IgE humana. Aquestes es van incubar amb les mostres de sèrum sense diluir per atrapar les IgEs. A continuació es van afegir els diferents adductes d'NKAx i finalment l'estreptavidina amb l'enzim.

Una de les grans limitacions d'aquests assaigs era el volum de mostra, en teníem poca i necessitàvem utilitzar al voltant de 200 µL de cadascun dels sèrums per assaig. Per aquest motiu, abans de començar a analitzar cada mostra de sèrum per separat, es va decidir fer un primer experiment on es va utilitzar una barreja de totes les mostres de sèrum, on també es va utilitzar els tres adductes barrejats a la mateixa concentració (**Figura 5.13.**).

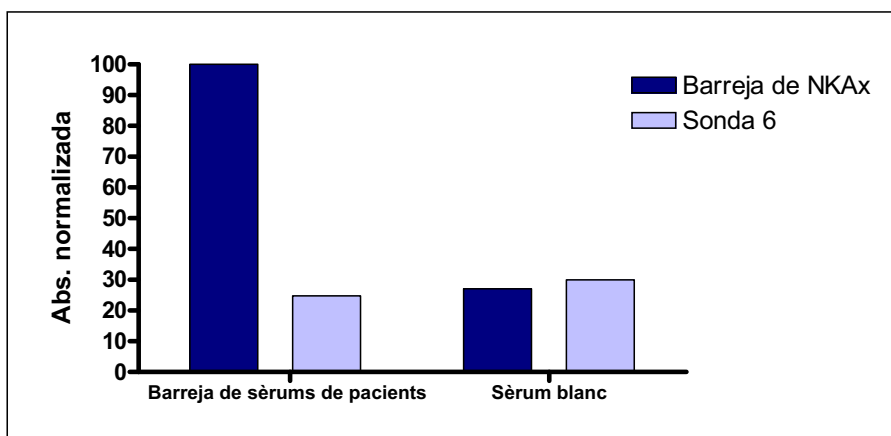


Figura 5.13. Resultats preliminars dels assaigs amb partícules magnètiques per al diagnòstic d'al·lèrgies a amoxicil·lina utilitzant les sondes peptídiques. Per aquest assaig tant les mostres de sèrums com els diferents adductes es van utilitzar com a mesclades.

En la **Figura 5.13.** es pot observar com veritablement hi ha un reconeixement específic només quan s'utilitza la barreja d'adductes amb la barreja de sèrums específics. A la vista d'aquests resultats es va realitzar aquest mateix assaig però de manera individualitzada per cadascun dels sèrums i dels adductes. Per comprovar si certament hi havia senyal específic, es van comparar els resultats amb la resposta que oferien dos blancs, el blanc d'adducte (la sonda

6) i el blanc de sèrum (barreja de diversos sèrums suposadament no específics). A la **Figura 5.14.** s'observen els resultats de cadascun dels sèrums assajats utilitzant l'adducte NKAx1. De tots ells, s'observa que hi ha una diferència veritablement significativa pels sèrums 4, 5, 11, 12, 13, 14, 15 i 18. Els altres mostren diferències poc significatives, tot i que sempre amb una tendència lleugerament superior que els sèrums blancs. En algun cas es va poder observar un senyal provinent de la sonda 6 i similar a la de l'adducte NKAx1 (Sèrum 3). La variabilitat en el senyal de la sonda 6 en front dels diferents sèrums pot ser deguda a dos factors, a un efecte matriu degut al fet de treballar amb sèrum sense diluir o a algun error en l'experiment. Cal recordar que teníem molt poca quantitat de mostra, i no sempre es podien fer rèpliques.

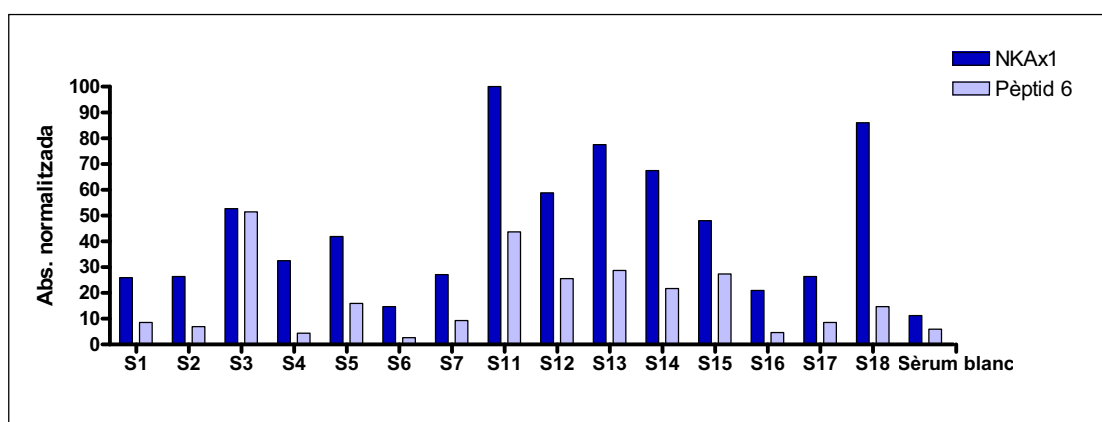


Figura 5.14. Avaluació dels sèrums específics en front l'adducte NKAx1.

El mateix assaig es va realitzar amb els adductes NKAx2 i NKAx3 (**Figura 5.15.** i **Figura 5.16.**, respectivament). Pel cas de l'adducte NKAx2, novament van aparèixer sèrums amb una resposta positiva enfront aquest (sèrums 1, 5, 7, 12, 13, 14, 15, 16, 17 i 18). D'altres tenien un comportament molt similar al del sèrum blanc (Sèrum 2, 4 i 6). També en aquest cas es va observar senyal no específic per alguna de les mostres (Sèrum 3).

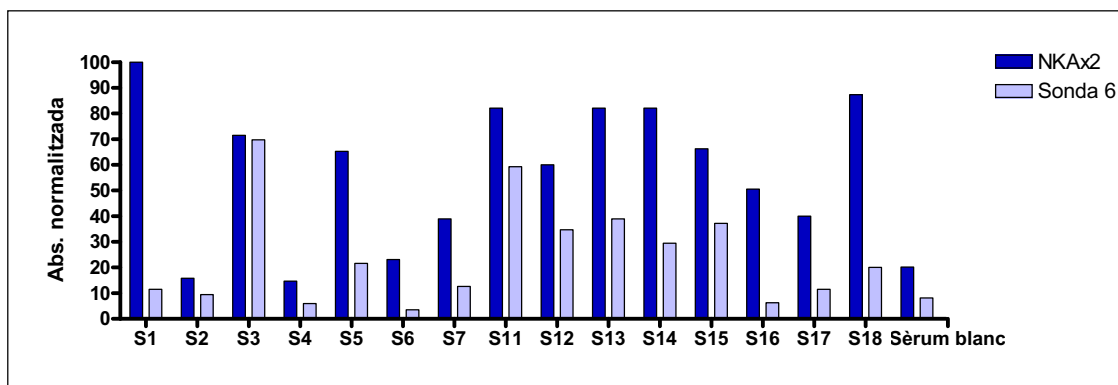


Figura 5.15. Avaluació dels sèrums específics en front l'adducte NKAx2.

El perfil de reconeixement dels adductes NKAx1 i NKAx2 és molt similar. Aquests resultats són comprensibles si es té en compte que aquests dos adductes són molt similars estructuralment (Capítol 2).

L'adducte NKAx3 representa el determinant antigènic majoritari, és a dir, el que s'utilitza en tots els tests comercials *in vitro* pel diagnòstic d'al·lèrgies a penicil·lines. En realitzar l'assaig amb aquests adductes, només es van detectar 2 sèrums que veritablement presentaven una resposta clarament positiva (Sèrum 1 i 3), i tres que seguien aquesta tendència (Sèrum 4, 5 i 6). Tots els altres van presentar un comportament molt similar a la del sèrum no específic.

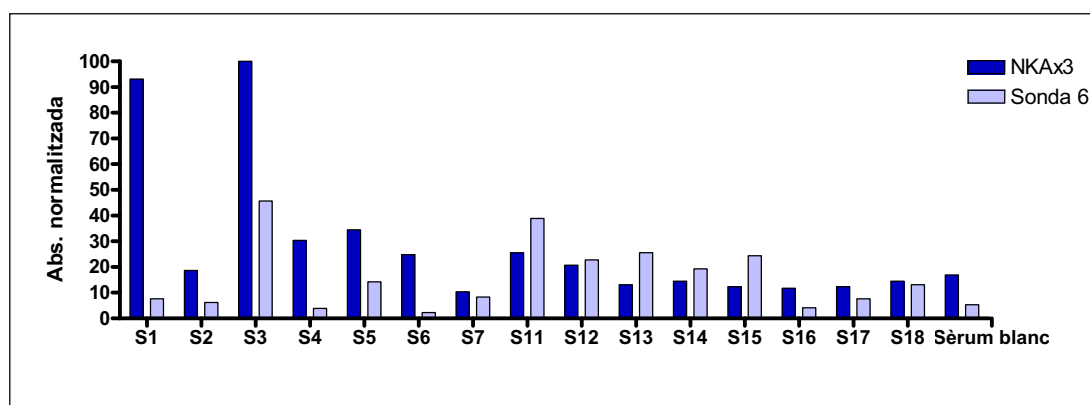


Figura 5.16. Avaluació dels sèrums específics en front l'adducte NKAx3.

En resum, a la **Figura 5.17**, es mostra el senyal obtingut de l'avaluació de totes les mostres (15 sèrums) en front a tots tres adductes. El senyal final representat és la diferència entre el senyal específic obtingut per l'adducte menys el senyal obtingut per la sonda peptídica 6 (efecte matriu).

La línia continua horitzontal marca el senyal no específic, es a dir el senyal obtingut d'utilitzar els diversos adductes (NKAx1, NKAx2 i NKAx3) amb els sèrums no específics (blancs). Aquesta mesura és la mitjana de 18 rèpliques. Les dues línies horitzontals puntejades representen l'error associat a la mesura anterior.

Per tant, tots els sèrums que queden per sobre de la línia horitzontal superior puntejada es poden considerar mostres que contenen IgE específiques. Observant els resultats, totes les mostres van donar una resposta específica almenys a un dels tres adductes. De fet, l'adducte **NKAx1** va ser reconegut en un **87%** de les mostres, l'adducte **NKAx2** en un **80%** de les mostres i l'adducte **NKAx3** en un **40%**. Un percentatge molt elevat de les mostres assajades van donar positiu. Això demostra la idoneïtat d'aquest assaig en front dels que hi ha ara comercials. També mostra que els derivats antigènics o epítops més reconeguts són els

que s’han descobert en aquest treball, els quals mai abans s’havien caracteritzat ni molt menys assajat. Això obre les portes a revisar els mecanismes involucrats a l’al·lèrgia a penicil·lines, a més del desenvolupament d’assaigs molt més específics que els que hi ha actualment.

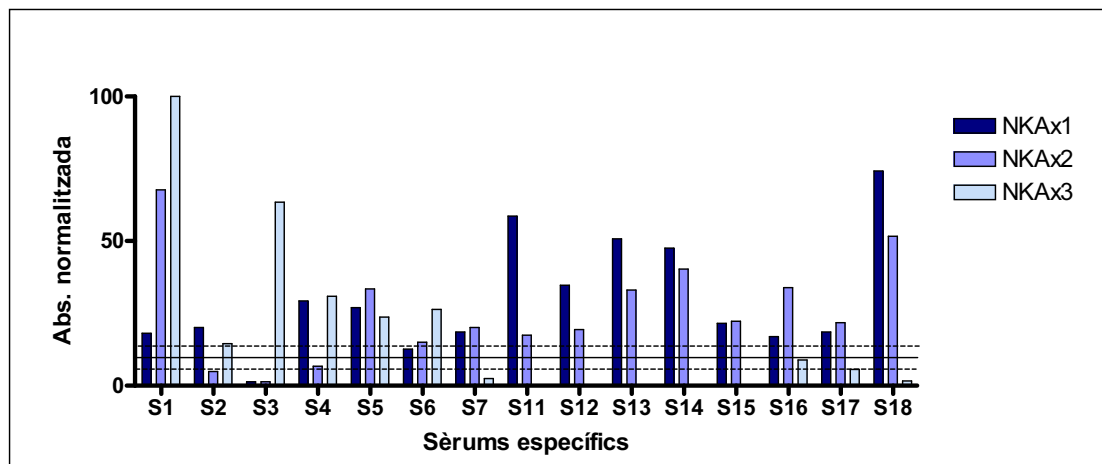


Figura 5.17. Representació global del reconeixement específic de IgEs utilitzant els adductes NKAx.

5.4. Microarrays (Micromatrius)

La utilització de matrius peptídiques, cadenes d’ADN o bioreceptors moleculars, ha obert un ventall d’oportunitats en camps com la investigació i el diagnòstic al permetre recollir una informació extensa al voltant d’un determinat fenomen fisiològic. Els “microarrays” es defineixen com una matriu bidimensional de receptors moleculars, que permeten l’automatització simultània d’assaigs, encaminats a conèixer en profunditat el reconeixement específic de marcadors biològics. A finals dels anys 80 quatre científics, Stephen Fodor, Michael Pirrung, Leighton Read i Lubert Stryer, van desenvolupar una revolucionària tecnologia per a la determinació i quantificació d’ADN en una mostra. Aquesta tecnologia desembocaria posteriorment en la primera plataforma de microarrays de ADN [209]. La principal avantatge d’aquesta innovadora tecnologia en front els mètodes tradicionals recau en la possibilitat d’analitzar simultàniament milers d’analits. Actualment aquesta tecnologia s’està utilitzant en l’anàlisi de l’expressió genètica, detecció de mutacions i polimorfismes, seqüenciació, seguiment de teràpia, medicina preventiva, screening i toxicologia de fàrmacs, i diagnòstic molecular.

En el camp del diagnòstic d’al·lèrgies, els microarrays donen la possibilitat d’identificar la presència d’IgE específiques per un ampli ventall de determinants antigènics potencials. De fet, en l’any 2002, Valeta i col·laboradors [210] van publicar el desenvolupament i aplicació

d'un microarray per al diagnòstic de reaccions al·lèrgiques de diversa naturalesa proteica (productes alimentaris, pol·len, animals...).

Els chips de microarray s'han començat a comercialitzar amb l'ImmunoCAP Immunosorben Allergen Chip (ISAC) i l'Immuno Solid phase Allergen Chip (VBC Genomics-Phadia). Actualment contenen 103 al·lèrgens de 43 fonts diferents. El volum de mostra és molt petit, només s'utilitzen 20 µL de sèrum per chip. Després d'unes 2 hores d'incubació, els chips es netegen i les IgEs enllaçades es detecten mitjançant la utilització d'una anti IgE unida a un compost fluorescent (**Figura 5.18.**). La sensibilitat analítica de l'ISAC varia en funció de cada al·lèrgen en particular i generalment és menor que la del sistema ImmunoCAP.

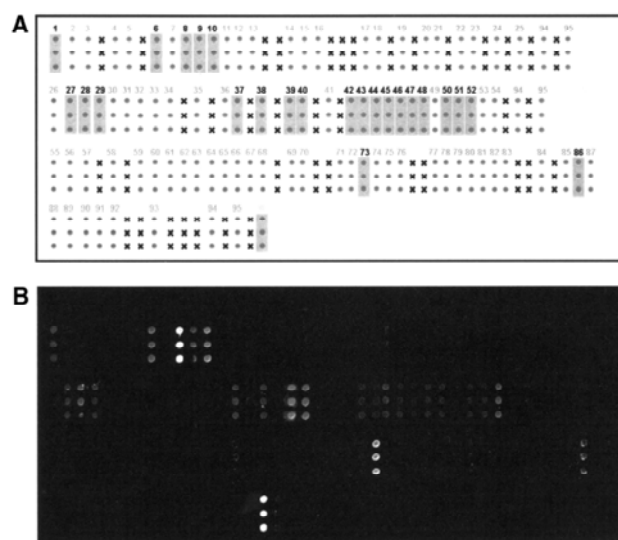


Figura 5.18. Microarray dissenyat per Valera i col·laboradors. En el requadre A s'observen els 103 al·lèrgens testats per triplicat per el sèrum d'un pacient al·lèrgic. En el requadre B es mostra una fotografia real del microarray amb detecció fluorescent

Posteriorment es van desenvolupar altres microarrays per a la detecció específica de diversos al·lèrgens, tots ells de naturalesa proteica [211-214]. Fins al moment no hi ha cap microarray destinats a la detecció de IgE específiques contra xenobiòtics de baix pes molecular. Els motius radiquen principalment en la falta de coneixements dels mecanismes implicats en aquest tipus de reaccions, la varietat d'estructures químiques derivades d'un mateix compost que poden estar implicades en la generació de la resposta al·lèrgica i la dificultat per a obtenir-les de manera pura i aïllada.

5.5. Desenvolupament d'un microarray per al diagnòstic d'al·lèrgies a penicil·lines

L'objectiu final d'aquest treball és el desenvolupament d'un microarray per al diagnòstic d'al·lèrgies a penicil·lines, on es pugui avaluar de manera simultània, i només amb una petita quantitat de sèrum, tots els antígens i adductes sintetitzats. Per poder dur a terme aquesta última part, es van haver de funcionalitzar superfícies de vidre, immobilitzar puntual i ordenadament tots els antígens i adductes mitjançant la utilització d'un dispensador de microgotetes i finalment dissenyar l'assaig per validar els bioconjugats i avaluar els sèrums específics.

5.5.1. Funcionalització de la superfície de vidre

La funcionalització de les superfícies de vidre es va realitzar seguint el protocol descrit a l'apartat 7.2.7.2.1.. Consisteix en transformar els grups sililoxi del vidre en grups epoxi mitjançant el reactiu GOPTS (**Figura 5.19.**). Per tal de que aquesta reacció en superfície sigui efectiva, prèviament s'ha de realitzar una neteja de la superfície en medi àcid oxidant i una posterior activació del grup –OH en medi alcalí.

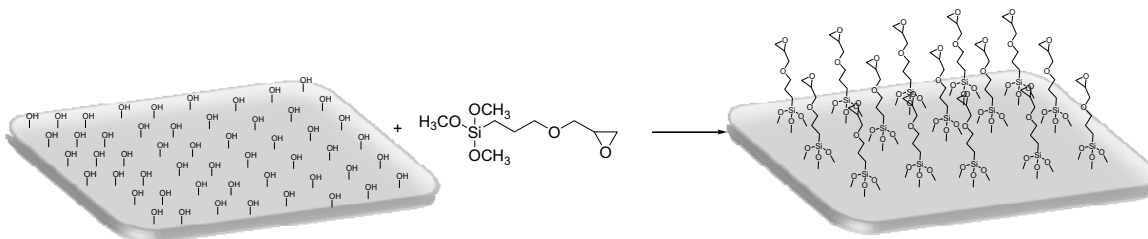


Figura 5.19. Funcionalització de la superfície de vidre per immobilitzar bioconjugats.

5.5.2. Immobilització dels bioconjugats

5.5.2.1. Immobilització dels adductes NKAx

Per tal d'immobilitzar els adductes NKAx sobre la superfície de vidre va ser necessària una etapa prèvia d'unió d'aquests a estreptavidina. El bioconjugat resultant va ser el que es va immobilitzar sobre la superfície del microarray. La formació d'aquest complex Estreptavidina-adducte, es va optimitzar per a diferents concentracions d'estreptavidina i a diferents equivalents d'adducte. La seva preincubació es va realitzar en medi alcalí a 37 °C. Teòricament

cada molècula d'estreptavidina pot unir-se fins a 4 molècules d'adducte. Tenint en compte aquesta relació, es va escollir la combinació que més s'aproximava al màxim teòric.

Un cop resolta la relació estreptavidina/adducte, tots els complexos, així com la estreptavidina-sond **6** i la estreptavidina sola, varen ser dipositades sobre la superfície el microarray. Els grups amino de l'estreptavidina van reaccionar amb els grups epoxi de la superfície. A la **Figura 5.20**, s'observa una representació del format de microarray final, on per cada mostra es van preparar 5 rèpliques.

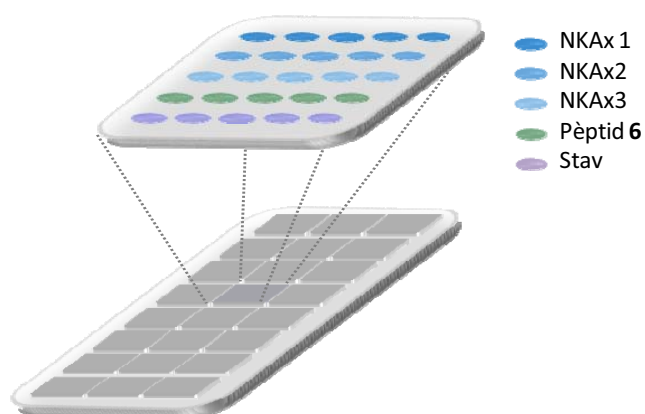


Figura 5.20. Immobilització dels complex NKAx-estreptavidina i peptid **6**-estreptavidina sobre la superfície de vidre amb 5 rèpliques cadascun.

5.5.2.2. Immobilització dels antígens penicil·línics

La immobilització dels antígens penicil·línics es va fer directament sobre la superfície de vidre a una concentració de 1 µg/mL en "printing" buffer. Novament, en una única superfície es van poder immobilitzar un total de 12 antígens (Amx1-AD, Amp1-AD, PG1-AD, PV1-AD, Amx2-Mp-BSA, Amp2-Mp-BSA, Amp2-I-BSA, Amx3-I-BSA, Amx4-BSA, Amp4-BSA, PenV4-BSA, PenG4-BSA) i 3 blancs (BSA, AD i PBST) per triplicat cadascun d'ells.

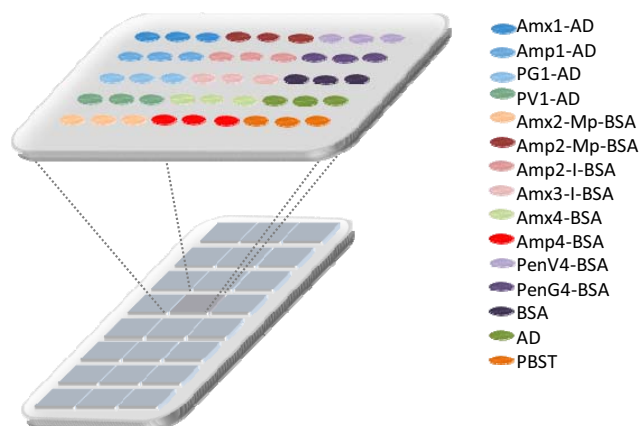


Figura 5.21. Immobilització dels antigens penicil·línics sobre la superfície de vidre per triplicat.

5.5.3. Validació dels adductes

El model d'assaig que es va utilitzar per a validar els adductes va ser en format indirecte (**Figura 5.22.**). Un cop immobilitzats els diferents adductes es va introduir una dilució de l'As218 en PBST, i finalment es va addicionar un anticòs secundari unit a TRITC (rodamina funcionalitzada amb el grup isotiocianat) per a l'obtenció de la resposta fluorescent.

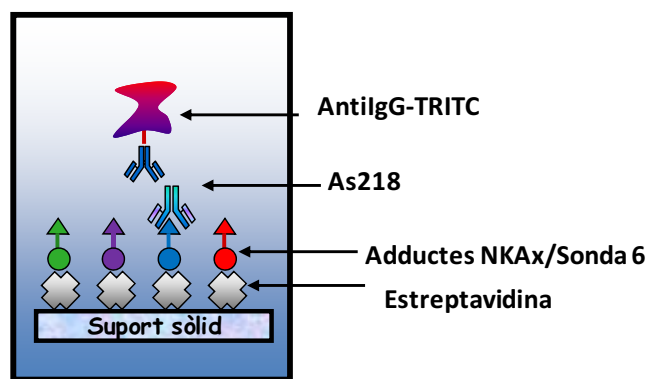


Figura 5.22. Format utilitzat per a validar els adductes NKAx sobre superfície de vidre.

Primerament es va determinar la quantitat d'estreptavidina que calia utilitzar i quants equivalents dels adductes eren necessaris per a formar els complexos estreptavidina-adducte. Les 12 combinacions assajades combinaven tant concentracions d'estreptavidina de 25 µg/mL, 10 µg/mL i 5 µg/mL en "printing" buffer, com diferents equivalents dels adductes de 20, 10, 5 i 0. Les millors condicions van ser preincubant 25 µg/mL d'estreptavidina amb 5 equivalents dels adductes. Els resultats mostren que amb aquests equivalents era suficient per saturar els 4

punts d'unió de l'estreptavidina, mentre que la concentració d'estreptavidina va resultar ser directament proporcional amb la intensitat de senyal fluorescent (**Figura 5.23.**).

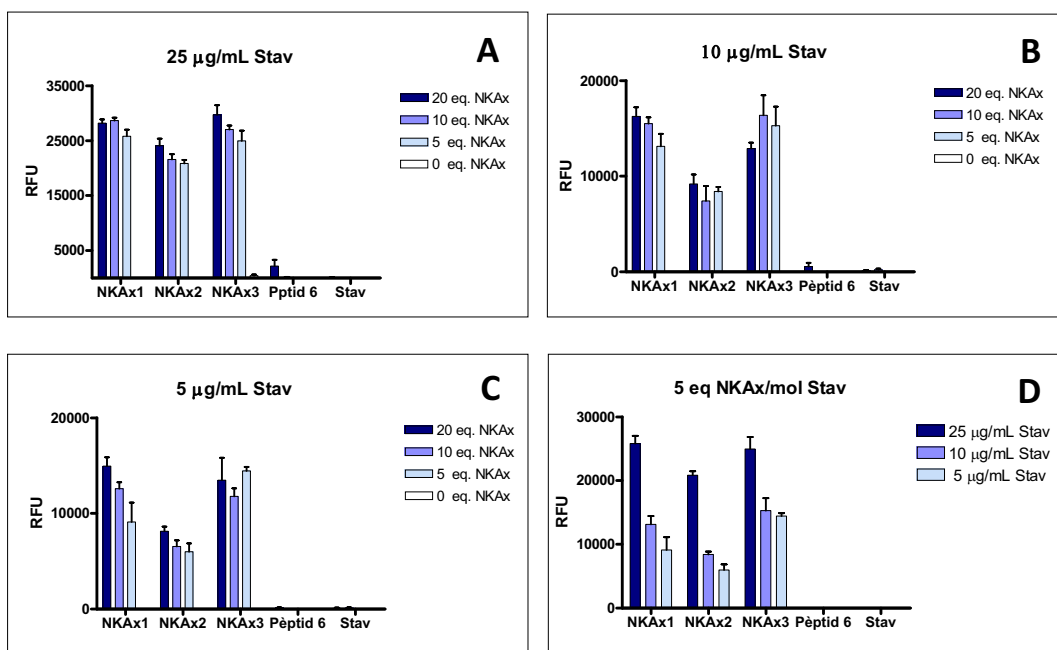


Figura 5.23. Optimització de la concentració d'estreptavidina i equivalents dels adductes en el microarray. Les gràfiques A, B i C mostren els estudis d'optimització variant els equivalents dels adductes a una concentració fixa d'estreptavidina. La gràfica D mostra els resultats obtinguts al variar la concentració d'estreptavidina mantenint els adductes a la mateixa concentració.

Un cop escollides les condicions òptimes de l'estreptavidina i dels adductes,, es va realitzar l'assaig de validació d'aquests, primerament utilitzant diferents dilucions de l'As218 en PBST (1/1000, 1/100000, 1/100000 i 0), i posteriorment dopant una mostra de sèrum no específic de conill amb l'As218 i a les mateixes dilucions. Aquesta mostra de sèrum no específic es va utilitzar sense diluir i dues dilucions en PBST (1/5 i 1/10) (**Figura 5.24.**).

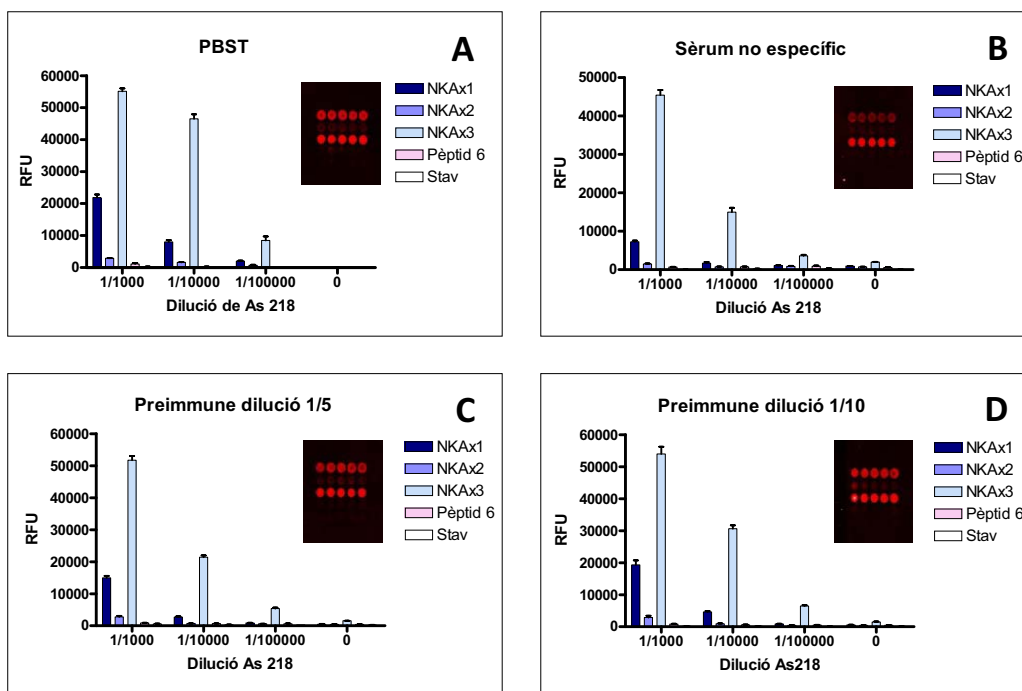


Figura 5.24. Assaig de validació dels adductes NKAx diluint As218 (A) en PBST i en sèrum no específic (B, C, D). Al costat de cada gràfic es pot observar una imatge del microarray corresponent a una dilució 1/1000 de l'As218.

En la **Figura 5.24.** es pot observar com l'adducte que més resposta presenta en format microarray és el NKAx3, mentre que el l'adducte NKAx2 pràcticament no es reconeix. En aquest cas, tant els blancs fets amb la sonda 6 com amb estreptavidina no van mostrar cap soroll inespecífic.

El fet de treballar amb sèrums diluïts disminueix el senyal específic dels adductes NKAx de manera proporcional a la concentració del sèrum. Tot i això es va escollir la dilució 1/5 per portar a terme els assaigs de detecció d'IgEs amb sèrums humans. Al tenir poca mostra calia assolir un compromís entre volum de mostra i dilució d'aquesta alhora de fer els assaigs.

5.5.4. Validació dels antígens

Per portar a terme la validació dels antígens es va utilitzar el mateix format que en el cas dels adductes. Es van immobilitzar els antígens sobre la superfície de vidre, seguidament es va introduir una dilució del As218 en PBST i finalment es va addicionar un anticòs secundari unit a TRITC (rodamina funcionalitzada amb el grup isotiocianat) per a obtenir la resposta fluorescent (**Figura 5.25.**).

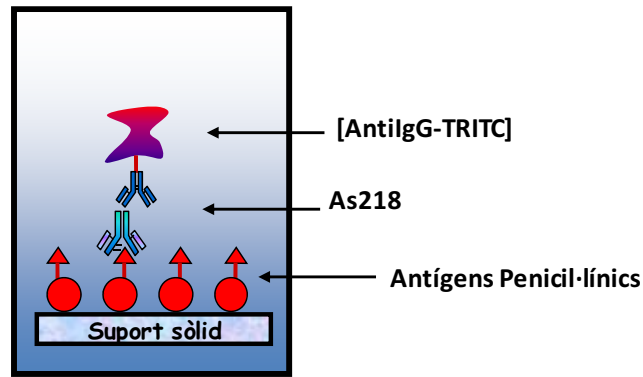


Figura 5.25. Representació del format utilitzat per la validació dels antígens sobre superfície de vidre.

Els antígens emprats van ser el Amx1-AD, Amp1-AD, PenG1-AD, PenV1-AD, Amx2-Mp-BSA, Amp2-Mp-BSA, Amp2-I-BSA, Amx3-I-BSA, Amx4-BSA, Amp4-BSA, PenV4-BSA, PenG4-BSA, utilitzant BSA, AD i PBST com a blancs. Com es pot observar a la **Figura 4.26**, tots els antígens van presentar una resposta més o menys intensa en front l'As218. Els antígens de tipus 1 i 3 van donar senyal fluorescent molt menys intensa en comparació amb els antígens de tipus 2 i 4. Molt probablement l'As218 tingui molta més afinitat pels antígens de tipus 2 ja que són homòlegs a l'immunogen utilitzat en la producció de l'As218. Aquest reconeixement és molt similar al observat en els immunoassaigs desenvolupats al capítol 4. Els antígens de tipus 4 van ser els més reconeguts. Aquests antígens corresponen a la forma oberta de les β -lactames. I aquest reconeixement tant gran demostra el fet que l'As218 reconeix especialment els derivats peniciloics, com també s'ha comprovat en l'especificitat dels immunoassaigs desenvolupats al capítol 4.

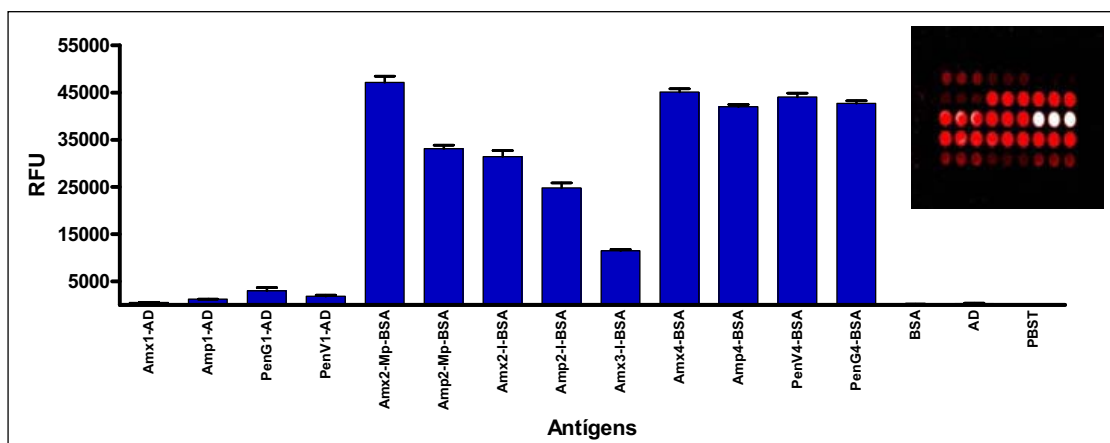


Figura 5.26. Validació dels diferents antígens en el format microarray.

5.5.5. Optimització de les condicions d'assaig amb sèrums no específics

Un cop validats tots els antígens i adductes, el següent pas va ser estudiar l'efecte matriu dels sèrums. Per tal de portar a terme aquest estudi es va utilitzar la barreja de sèrums no específics. Per tal de treballar amb sèrums humans es va haver d'utilitzar un anticòs secundari unit a TRITC específic contra IgE humana. Però per desgracia aquest nou anticòs secundari presentava soroll inespecífic en tota la superfície de vidre. Per aquest motiu, es va realitzar una optimització de l'assaig per tal de trobar les millors condicions possibles on el sèrum no específic presentés el mínim efecte matriu.

Es van modificar els buffers de rentat, utilitzant tampons Tris amb diferents surfactants (Tween 20, Tritom o SDS). També es va modificar el percentatge de Tween 20 durant l'assaig (0.05%, 0.1%, 0.2% i 0.5%), la molaritat del PBST (10 mM, 25 mM i 50 Mm) i el buffer en l'etapa d'immobilització sobre la superfície de vidre (printing buffer i SSC-betania). Cap d'aquests canvis va implicar una millora en termes de reducció de soroll inespecífic.

Altres canvis com ara el temps en la etapa d'incubació del sèrum, tractament previ de la mostra de sèrum filtrant amb llana de vidre o la precipitació d'immunoglobulines amb sulfat d'amoni, PEG 6000 o àcid caprílic tampoc van donar millors resultats.

En canvi, la incorporació d'una etapa de bloqueig, utilitzant un 1 % de llet en PBST just després d'immobilitzar els bioconjugats en la superfície de vidre, va ser suficient per observar una baixada de soroll inespecífic.

5.5.6. Mostres de sèrums de pacients al·lèrgics a penicil·lines

5.5.6.1. Detecció d'IgEs específiques a amoxicil·lina

Per últim només calia avaluar els sèrums específics mitjançant aquesta tècnica. Mitjançant el magneto-ELISA ja s'havia vist que era possible mesurar les mostres, i tot i que la tècnica no era molt sensible, pràcticament totes les mesures eren significativament positives. L'immunoassaig per la detecció d'IgEs específiques en format microarray es va dur a terme tal i com es descriu a la **Figura 5.27**. tant utilitzant els complexos estreptavidina-adducte com els antígens penicil·línics.

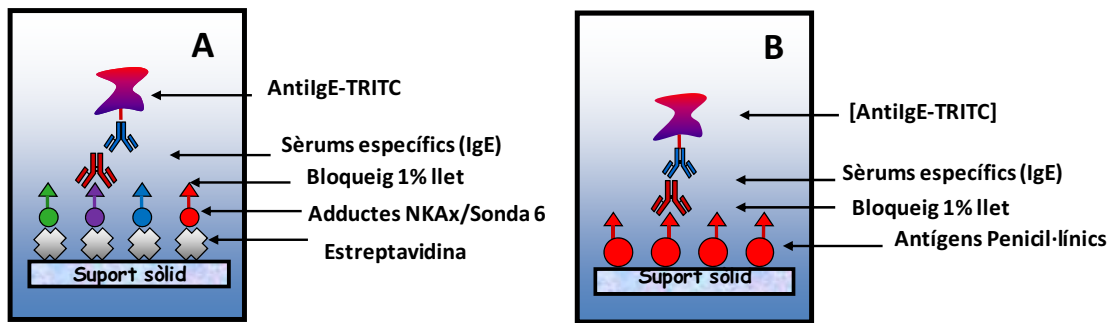


Figura 5.27. Formats utilitzat per a avaluar els sèrums específics en format microarray. (A) Amb els complexos estreptavidina-adducte, (B) amb els antígens penicil·línics.

Es van avaluar tots els sèrums específics que teníem, però en cap cas es va aconseguir una resposta significativament diferent, és a dir, detectar IgEs específiques. Aquesta manca de resposta podia ser deguda a varies hipòtesis, però dues d'elles eren més consistentes. Possiblement la tècnica de microarray no sigui suficientment sensible per a detectar una quantitat tan baixa d'immunoglobulines. Com s'ha comentat anteriorment, s'estima que el 10 % de les immunoglobulines E són específiques i la concentració en sèrum de IgEs totals en humans es considera aproximadament de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A això se li suma el fet que la mesura de la resposta és fluorescent i sense amplificació del senyal. Recordar que en el magneto-ELISA la resposta colorimètrica està catalitzada per un enzim. D'altra banda, la segona hipòtesi és el format de l'assaig. En aquest cas, el format és indirecte, és a dir, es presenten els antígens/adductes penicil·línics en front del total d'immunoglobulines que conté el sèrum, tant siguin IgE, IgG, IgA o IgM). Per tant, si també existeixen immunoglobulines de tipus IgG específiques a penicil·lines, recordar que la seva concentració en sèrum és 100 000 vegades major, és possible que siguin aquestes les que s'uneixin als derivats penicil·línics. Per tal de comprovar si aquesta última hipòtesi era factible, es van tornar a realitzar els assaigs utilitzat en aquest cas una anti-IgG humana unida al fluorescent Alexa 647.

5.5.6.2. Detecció de IgGs específiques a amoxicil·lina

El format d'assaig va ser el mateix que en l'apartat anterior, però utilitzant una anti-IgG en comptes d'una anti-IgE. Els resultats obtinguts, tant pel cas dels adductes com pel cas dels antígens es mostren a la **Figura 5.28.**

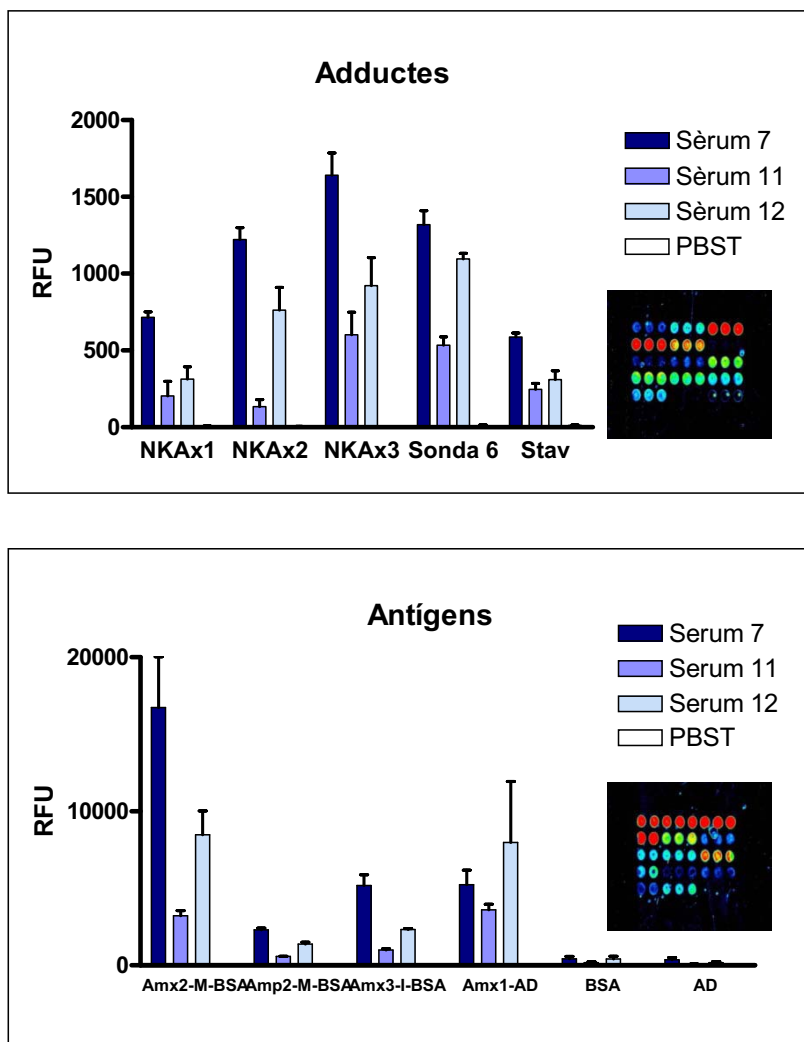


Figura 5.28. Assaig microarray per a la detecció de IgGs humanes específiques contra amoxicil·lina.

Tot i que els experiments no es van poder realitzar amb tots els sèrums per manca de mostra, sí que es pot concloure que en el cas dels antígens, aquests mostraven una resposta significativa a IgG específiques. Pel cas dels adductes, aquests estudis no eren conclouents per l'elevat efecte matriu que tenien les mostres tant amb la sonda peptídica com amb l'estreptavidina.

5.6. Resum i conclusions del capítol

Mitjançant el treball desenvolupat en aquest últim capítol es pot concloure que:

- Els nous determinants antigènics trobats amb les sondes peptídiques han estat validats amb IgGs específiques contra amoxicil·lina produïdes durant aquesta Tesi.

- Utilitzant el format magneto-ELISA s'ha pogut desenvolupar un assaig per detectar IgEs específiques a amoxicil·lina en sèrums de pacients al·lèrgics, on tots els sèrums han presentat una resposta positiva contra algun dels tres determinants antigènics testats.
- Tot i això, la detecció de IgEs específiques no ha sigut possible en microarray degut molt probablement, a dos causes: falta de sensibilitat i la inhibició del senyal per presència de IgGs específiques.

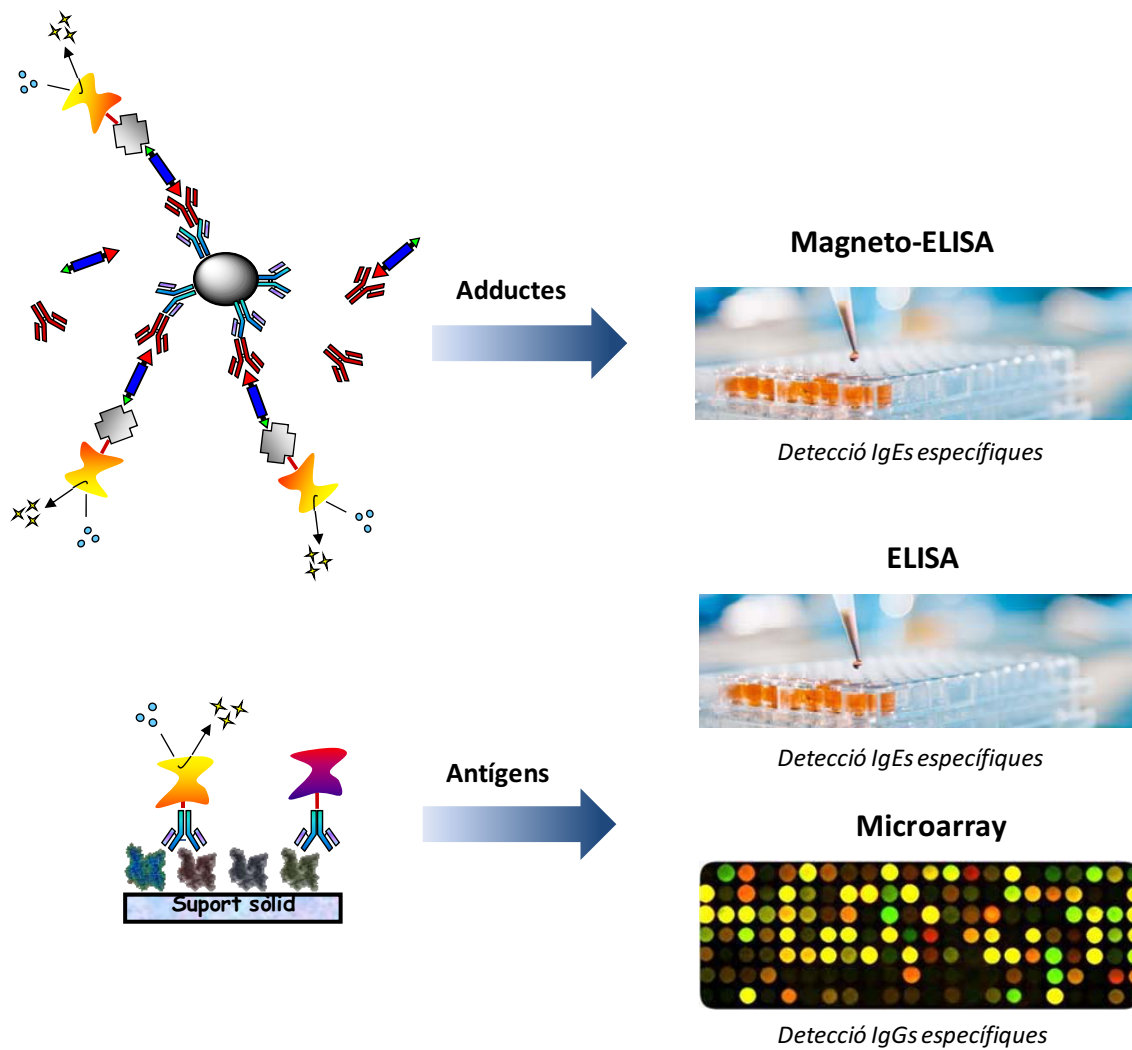


Figura 5.29. Resum esquemàtic de les aportacions descrites en aquest capítol.

6. Conclusions

1. Durant el transcurs d'aquesta Tesi, s'han sintetitzat i caracteritzat dues sondes peptídiques. Aquestes han estat especialment dissenyades per poder caracteritzar l'epítot resultant de la unió proteïna-fàrmac present durant el transcurs d'una reacció al·lèrgica. Mitjançant aquesta estratègia s'ha aconseguit generar 3 adductes provinents de la unió entre l'amoxicil·lina i la sonda, dos dels quals no havien estat descrits anteriorment. Aquests dos nous adductes han estat elucidats confirmant tots dos la formació d'una nova estructura antigènica provinent de l'amoxicil·lina. Mitjançant aquests determinants antigènics s'ha aconseguit desenvolupar un immunoassaig per detectar IgEs específiques en sèrums de pacients al·lèrgics utilitzant el magneto-ELISA, on tots els sèrums han presentat una resposta positiva contra algun dels tres adductes. Aquests estudis demostren la gran utilitat que representa utilitzar sondes peptídiques en el camp del diagnòstic clínic. Així doncs, aquest treball aporta les eines necessàries per a augmentar el coneixement actual sobre la formació i caracterització de qualsevol determinant antigènic produït per la unió d'una proteïna endògena a un fàrmac.
2. S'ha aconseguit desenvolupar un immunoassaig per detectar penicil·lines amb una detectabilitat inferior als valors de MRL establerts per aquests antibiòtics en mostres de llet. Els anticossos utilitzats en l'assaig han demostrat tenir una elevada afinitat per l'àcid amoxiciloic (forma oberta de l'amoxicil·lina) i per tant, amb un senzill tractament d'hidròlisi es pot detectar tant l'amoxicil·lina com l'àcid amoxiciloic present en una mostra de llet. La gran avantatge de detectar la forma oberta de les penicil·lines és que no tan sols es pot conèixer si una mostra està contaminada amb aquest antibiòtic sinó que també si s'ha adulterat la llet amb β -

lactameses. Pràctica habitual per evitar la presència de penicil·lines en els productes làctics.

MATERIALS I MÈTODES

7. Materials i mètodes

7.1. Part sintètica

7.1.1. Materials i instrumentació

Les cromatografies en capa fina (CCF) van ser realitzades sobre plaques analítiques de gel de sílice (F₂₅₄ Merck, Darmstadt, Germany) amb un gruix de 0.25 mm. L'eluent emprat s'indica entre parèntesi en cadascun dels casos i els valors d' R_f descrits són aproximats. El revelador usat va ser la llum UV (254 nm).

Els espectres **d'infraroig** van ser enregistrats amb l'espectrofotòmetre de transformada de Fourier Bomen MB 120 FTIR (Hartmann & Braul, Quebec, Canadà). Les mostres sòlides van ser analitzades en forma de disc de KBr i les líquides en forma de film sobre pastilles de NaCl. A la descripció dels espectres només apareixen les freqüències més significatives en cm^{-1} .

Els espectres d'**RMN** van ser enregistrats en un aparell Varian 300 Unity Plus (^1H a 300 MHz i ^{13}C a 75.4 MHz), en un Varian Mercury 400 (^1H a 400 MHz i ^{13}C a 100.6 MHz) i en un espectròmetre Varian Inova 500 (500 MHz per a ^1H i 125 MHz per a ^{13}C) (Varian Inc. Palo Alto, CA, USA). Els desplaçaments químics es donen en unitats δ (ppm) respecte a una referència interna de tetrametilsilà (en RMN de ^1H), o bé, respecte al CDCl_3 (en RMN de ^{13}C ; 77.0 ppm) i les constants d'acoblament (J) en Hz. En aquells casos en què va ser necessari, les assignacions van ser confirmades mitjançant experiments de DEPT o experiments bidimensionals (COSY, HSQC, HMBC o NOESY). La multiplicitat dels senyals als espectres de ^1H s'indica utilitzant les abreviatures següents: s = singlet, br s = singlet ample, d = doblet, t = triplet, q = quadruplet, dd = doblet de dobles, dt = doblet de triplets, dq = doblet de quadruplets, ddd = doblet de dobles de dobles, ddq = doblet de dobles de quadruplets, td = triplet de dobles, m = multiplet.

Les cromatografies en columna sobre gel de sílice van ser realitzades a baixa pressió (*flash*) amb gel de sílice de 0.040–0.063 mm de grandària de partícula (SDS). L'eluent emprat s'indica en cada cas.

Els **anàlisis per HPLC** es van realitzar amb un equip Merck Hitachi, que consta de: bomba Merck Hitachi L-2130, detector diode array L-2455, injector automàtic L-2200 (Merck, Darmstadt, Germany). Els cromatogrames es van processar mitjançant el programa EZChrome Elite. La columna analítica que s'utilitzà va ser una LiChroCART 100 RP-18 125×4 (5 µm; Merck, Darmstadt, Germany) i la columna preparativa va ser una HIBAR Purospher STAR RP-18 endcapped (5 µm; Merck, Darmstadt, Germany). Els mètodes utilitzats s'indiquen en cada cas.

Els **espectres de masses** d'alta resolució HRMS (*High Resolution Mass Spectrometry*) van ser enregistrats en un aparell LC/ESI-TOF on el UPLC va ser un Waters Acquity Ultra Performance LC amb columna Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm, 2.1 × 100 mm i el ESI-TOF fou un Waters LCT Premier XE Micromass technologies. I els espectres de MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*) van ser enregistrats en un aparell Bruker autoflex III Smartbeam.

Els dissolvents i reactius emprats en les reaccions van ser purificats seguint els procediments estàndards. A les extraccions, separacions i les diverses cromatografies els dissolvents van ser de qualitat de síntesis.

Els aminoàcids utilitzats i la resina Nova PEG Wang per a la síntesis en fase sòlida van ser adquirits a Novabiochem (Merck, Darmstadt, Germany).

Tots els reactius utilitzats en les etapes sintètiques van ser subministrats per Sigma-Aldrich Co. (Milwaukee, WI, USA).

Els agitadors magnètics utilitzats van ser RTC basic IKAWerke, els rotavapors van ser Laborota 4001_efficient Heidolph Instruments, el pHmetre va ser un pH540 GLP WTC. La liofilitzadora va ser Labconco Freeze dry system Freezone Plus 6. El sonicador utilitzat va ser adquirit a Fischer Scientific.

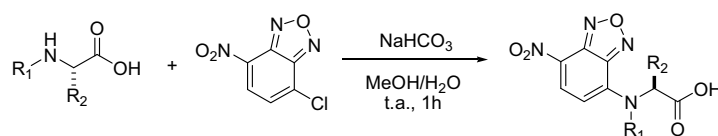
7.1.2. Síntesi de les sondes peptídiques

7.1.2.1. Derivatització dels aminoàcids

7.1.2.1.1. Procediment general

Els aminoàcids (3.75 mmols) i el NBD-Cl (500 mg, 2.5 mmols) es van dissoldre en 55 mL de MeOH. Immediatament, es va afegir una solució de NaHCO₃ 0.75 M (14 mL). La mescla de reacció es va agitar durant 1.5 hores, a 55 °C tapada de la llum. La mescla va adquirir un color taronja i un aspecte tèrbol.

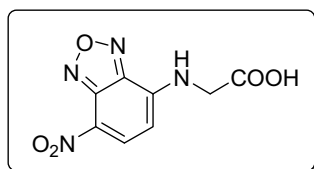
La solució es va concentrar al buit. El residu resultant es va diluir en Et₂O i es va netejar en una solució saturada de NaHCO₃. La fase aquosa es va acidificar amb una solució 1N HCl fins a pH 3 i finalment es va extraure amb AcOEt. La fases orgàniques es va assecar amb MgSO₄ i es va evaporar al buit. L'oli resultant es va purificar mitjançant cromatografia en columna amb gradient (AcOEt:MeOH:H₂O) . Els resultats obtinguts es resumeixen a la següent **Taula**:



Taula 7.1. Resultats obtinguts en la síntesi dels aminoàcids modificats.

Reacció	Grup R1	Grup R2	Rendiment (%)
R1	H	H	87
R2	H	CH ₂ COOtBu	62
R3	Me	CH ₂ COOtBu	79

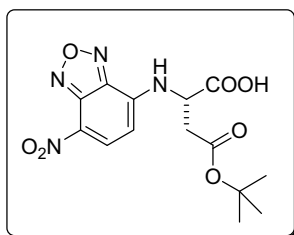
Àcid 2-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)acètic (1)



1

Sòlid taronjós-marró. R_f (AcOEt/MeOH 90:10) = 0.07. IR (KBr): 3361, 3064, 1719, 1620, 1585, 1531, 1503, 1451, 1419, 1398, 1354, 1314, 1279, 1239, 1192, 1135, 1059. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) δ 9.29-9.27 (1H, m, COOH), 8.59 (1H, d, $J = 8.8$, NO₂CCH), 6.42-6.40 (1H, m, NO₂CCHCH), 4.45-4.25 (2H, m, CH₂). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl₃) δ 169.3, 144.9, 143.9, 143.8, 136.8, 121.7, 100.5, 44.9.

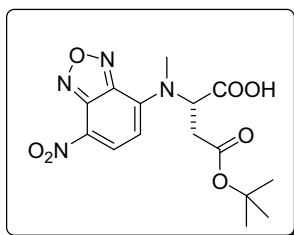
Àcid (S)-4-tert-butoxy-2-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-4-oxobutanoic (2)



2

Sòlid taronjós-marró. R_f (AcOEt/MeOH 90:10) = 0.06. IR (Br): 3369, 3110, 3018, 2985, 2933, 1753, 1701, 1625, 1573, 1533, 1487, 1454, 1410, 1382, 1368, 1348, 1292, 1226, 1159, 1118, 1075, 1037. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl₃) δ 10.05-9.89 (1H, m, COOH), 8.45 (1H, d, $J = 8.5$, NO₂CCH), 7.11-7.10 (1H, m, NH), 6.31 (1H, d, $J = 8.5$ NO₂CCHCH), 4.95-4.82 (1H, m, NHCH), 3.31 (1H, dd, $J = 17$, $J = 5$, CH_xCH_y), 3.08 (1H, dd, $J = 17$, $J = 5$, CH_xCH_y), 1.44 (6H, s, C(CH₃)₃). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) δ 178.2, 169.5, 144.4, 143.8, 142.6, 136.2, 125.2, 100.3, 83.5, 52.7, 37.1, 28.0. HRMS (+ESI): m/z calculat per a C₁₄H₁₇N₄O₇ [M + H]⁺ 353.1097, trobat 353.1082, (-ESI): m/z calculat per a C₁₄H₁₅N₄O₇ [M - H]⁻ 351.0941, trobat 351.0944.

Àcid (S)-4-tert-butoxy-2-(methyl(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)-4-oxobutanoic (3)



3

Sòlid taronjós-marró. R_f (AcOEt/MeOH 90:10) = 0.06. **IR** (KBr): 3521, 3109, 2981, 2933, 1728, 1613, 1545, 1500, 1423, 1369, 1305, 1219, 1154, 1066. **RMN de ^1H** (500 MHz, DMSO) δ 8.53 (1H, d, $J = 9.0$, NO_2CCH), 6.58 (1H, d, $J = 9.0$, NO_2CCHCH), 6.20-6.35 (1H, m, CH_3NCH), 3.31 (3H, s, NCH_3), 3.12 (1H, dd, $J = 16$, $J = 6$, CH_xCH_y), 2.99 (1H, dd, $J = 16$, $J = 8.5$, CH_xCH_y), 1.28 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, DMSO) δ 170.0, 168.7, 145.9, 144.5, 144.5, 136.2, 122.2, 103.4, 80.6, 61.0, 36.4, 35.6, 27.4. **HRMS** (-ESI): m/z calculat per a $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_7$ [M - H]⁻ 365.1097, trobat 365.1093.

7.1.2.2. Síntesi de pèptids en fase sòlida mitjançant l'estratègia Fmoc/tBu

La síntesi en fase sòlida dels pèptids sintetitzats en aquest treball es va realitzar manualment, utilitzant xeringues de polipropilè (de volum variable en funció de la quantitat de resina utilitzada en cada cas) equipades amb filtre de polietilè porós. L'agitació manual es va realitzar amb una vareta de tefló, i l'agitació mecànica mitjançant un agitador vòrtex horitzontal. Després de cada cicle, els excessos de reactiu, dissolvents i possibles subproductes que es poguessin trobar en dissolució es van eliminar per filtració al buit.

7.1.2.2.1. Assaig de ninhidrina qualitatiu

Aquest assaig va permetre avaluar qualitativament l'eficiència dels acoblaments dels aminoàcids a la fase sòlida, mitjançant la detecció colorimètrica de grups amino primaris lliures a l'extrem N-terminal de la cadena peptídica en creixement. Per a dur a terme l'assaig es van utilitzar 3 dissolucions diferents de reactius:

- Fenol ~ 80% en MeOH
- KCN en H_2O /piridina
- Ninhidrina, 6% en etanol

Es van introduir en un tub petit de vidre una alíquota de peptil-resina (0.5-2 mg), prèviament rentada amb CH_2Cl_2 i assecada al buit. Es van afegir 2 gotes de cadascun dels 3 reactius i es va escalfar a 120 °C durant 3 min. El color blau de la dissolució i de la resina indica la presència de grups amino primaris lliures (assaig positiu), i per tant un acoblament incomplet, mentre que el color groc indica l'absència d'amines primàries (assaig negatiu), i per tant la incorporació de l'aminoàcid és superior al 99.5%.

7.1.2.2.2. Assaig per determinar el grau de conjugació

Es va afegir una solució de DBU en DMF (2% v/v)(14 mL) a una mostra de resina (5 mg). La suspensió es va agitar durant 30 minuts. La mescla es va diluir en ACN i una alíquota de la solució (3.4 mL) es va transferir a un recipient graduat per a una posterior dilució amb ACN (42.5 mL). Una solució referència es va preparar de la mateixa manera però sense l'addició de resina.

Quantificació del grup Fmoc: Les dos solucions anteriors es van transferir a una cubeta de quars de 1 cm de longitud. L'Absorbància es va llegir a 304 nm i el grau de conjugació es va calcular utilitzant l'equació de Lambert-Beer ($\epsilon = 7624 \text{ M}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$).

7.1.2.2.3. Tractament inicial de la resina

Abans d'iniciar una síntesi en fase sòlida sobre un suport polimèric, cal solvatar la resina adequadament i rentar-la de possibles impureses.

La resina nova PEG Wang es va inflar amb DMF. Es va agitar durant 1 hora i es va rentar 3 vegades amb DMF.

7.1.2.2.4. Activació del primer aminoàcid (AA₁)

El AA₁ es va dissoldre en CH₂Cl₂ anhidre i DMF (80:3). La solució es va refredar fins a 0 °C i seguidament es va afegir gota a gota la DIC. Es va agitar durant 1 hora a 0 °C sota atmosfera d'argó. Es va observar l'aparició d'un precipitat blanc. La solució es va concentrar i es va dissoldre en DMF.

7.1.2.2.5. Unió del AA₁

La solució de AA₁ activat es va afegir a la resina. Una quantitat catalítica de DMAP (2.5 mg) va ser necessària per a portar a terme la reacció d'unió a la resina. La mescla es va agitar durant 4 hores. Tot seguit es va comprovar el grau d'acoblament del primer AA a la resina mitjançant el protocol de l'apartat 7.1.2.2.2.

7.1.2.2.6. Elongació de la cadena peptídica

El creixement de la cadena peptídica es va realitzar seguint el protocol descrit a la **Taula 7.2**. L'agent activador de l'àcid carboxílic va ser en tots els casos el HATU en presència de DIEA. L'eficiència de cada etapa d'acoblament es va comprovar qualitativament amb l'assaig de ninhidrina. Un cop finalitzada la síntesi, la peptil-resina es va rentar amb DMF (5×0.5 min), CH_2Cl_2 (5×0.5 min) i Et_2O (5×0.5 min).

Taula 7.2. Operacions a realitzar per a l'elongació de la cadena peptídica.			
Etapa	Reactiu	Operació	Temps
1	DMF	Rentat	5×0.5 min
2	20 % piperidina en DMF	Desprotecció	1×1 min
3	20 % piperidina en DMF	Desprotecció	2×10 min
4	DMF	Rentat	5×0.5 min
5	Fmoc-AA-OH 3 eq HATU 3 eq DIEA 6 eq	Acoblament	1 h
6	DMF	Rentat	5×0.5 min
7	CH_2Cl_2	Rentat	5×0.5 min
8	Assaig ninhidrina	Control	3 min

7.1.2.2.7. Desprotecció de les cadenes laterals del pèptid i desancoratge de la resina

La desprotecció de les cadenes laterals dels aminoàcids i el desancoratge dels pèptids de la resina es va portar a terme mitjançant acidòlisi, emprant la barreja més adient en funció de les característiques de la resina i de la seqüència peptídica en qüestió.

Es va dipositar la peptidil-resina seca en un baló de vidre i es va addicionar el reactiu acidolític en una proporció aproximada de 10 mL per cada 100 mg de resina. En aquest cas la solució va ser de TFA (95%), H_2O (2.5%) i TIS (2.5%). Es va deixar a temperatura ambient durant 6 hores amb agitació magnètica. Posteriorment, la mescla es va filtrar, la resina es va rentar i el filtrat es va concentrar al buit. El pèptid va precipitar per addició de Et_2O , es va separar per filtració i el precipitat obtingut es va rentar 3 vegades amb Et_2O . El pèptid es va

dissoldre en AcOH aquós al 10% i es va liofilitzar. Finalment, el cru peptídic es va analitzar mitjançant HPLC i espectrometria de masses UPLC-ESI.

7.1.2.2.8. Cromatografia líquida d'alta eficàcia

Tots els pèptids es van analitzar inicialment per HPLC en fase reversa. Les mostres es van eluir a un flux de 1 mL/min utilitzant gradients lineals dels dissolvents A: H₂O-0.1% TFA i B: MeOH (en el cas concret del pèptid **4** B: ACN). Seguidament, els pèptids es van purificar en condicions semipreparatives (lots de producte de fins a 5 mg) per HPLC en fase reversa. Les mostres es van eluir a un flux de 8 mL/ml, utilitzant gradients lineals dels dissolvents A: H₂O-0.1% TFA i B: MeOH. La detecció es va realitzar per UV. Els mètodes estan descrits en cadascun dels protocols dels pèptid sintetitzats.

7.1.2.2.9. Síntesi del pèptid NBD-GKK(Biotin)G-OH (**4**)

La síntesi d'aquest pèptid es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat 7.1.2.2., de la següent manera:

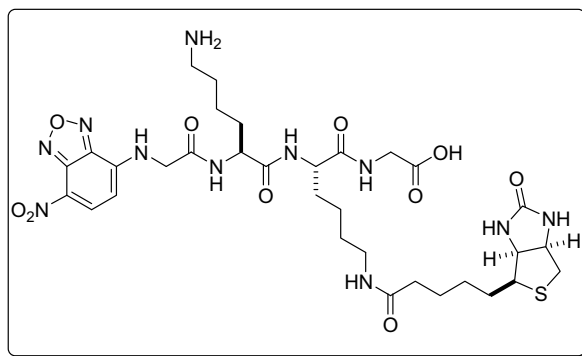
Aminoàcids protegits: Fmoc-Gly-OH (266 mg, 0.89 mmol), Fmoc-Lys(Boc)-OH (125 mg, 0.27 mmol), Fmoc-Lys(Biotin)-OH (160 mg, 0.27 mmol), NBD-Gly-OH (64.3 mg, 0.27 mmol).

Resina: Nova PEG Wang resin (100 mg).

Reactius per a l'acoblament dels aminoàcids: DIC (70 µL, 0.44 mmol), DIEA (92 µL, 0.54 mmol), HATU (100 mg, 0.27 mmol).

El desancoratge del pèptid té lloc per tractament de la peptidil-resina amb el mètode descrit a l'apartat 7.1.2.2.7.

Un cop purificat mitjançant HPLC, el pèptid resultant es va obtenir en un 4% de rendiment (2.0 mg).



4

Sòlid taronja. Puresa 98.9%, RP-HPLC Analític $t_R = 21,9$ min (gradient lineal de 95% de A durant 5 min, després de 95% a 40% d' A en 30 min, flux de 1 mL/min), **RP-HPLC Preparatiu** $t_R = 22,0$ min (gradient lineal de 90% de A durant 2 min, després de 90% a 75% d' A en 3 min, després de 75% a 55% d' A en 30 min flux de 8 mL/min, detecció per UV a 477 nm).

7.1.2.2.10. Síntesi del pèptid NBD-DKK(Biotin)G-OH (5)

La síntesi d'aquest pèptid es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat 7.1.2.2., de la següent manera:

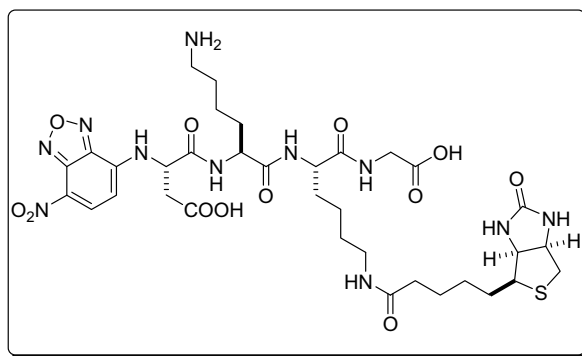
Aminoàcids protegits: Fmoc-Gly-OH (266 mg, 0.89 mmol), Fmoc-Lys(Boc)-OH (125 mg, 0.27 mmol), Fmoc-Lys(Biotin)-OH (160 mg, 0.27 mmol), NBD-Asp(OtBu)-OH (94 mg, 0.27 mmol).

Resina: Nova PEG Wang resin (100 mg).

Reactius per a l'acoblament dels aminoàcids: DIEA (92 μ L, 0.54 mmol), HATU (100 mg, 0.27 mmol).

El desancoratge del pèptid té lloc per tractament de la peptidil-resina amb el mètode descrit a l'apartat 7.1.2.2.7.

Un cop purificat mitjançant HPLC, el pèptid resultant es va obtenir en un 11% de rendiment (8.6 mg).



5

Sòlid taronja. Puresa 99.2%, RP-HPLC Analític $t_R = 17,0$ min (gradient lineal de 95% de A durant 5 min, després de 95% a 70% d' A en 25 min, flux de 1 mL/min), **RP-HPLC Preparatiu** $t_R = 36,6$ min (isocràtic de 45 min amb un 79% d' A, flux de 8 mL/min, detecció per UV a 477 nm), **HRMS (+ESI):** m/z calculat per a $C_{34}H_{50}N_{11}O_{12}S$ $[M + H]^+$ 836.3361, trobat 836.3392, **(-ESI):** m/z calculat per a $C_{34}H_{48}N_{11}O_{12}S$ $[M - H]^-$ 834.3205, trobat 834.3196.

7.1.2.2.11. Síntesi del pèptid NBD-D(Me)KK(Biotin)βA-OH (6)

La síntesi d'aquest pèptid es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat 7.1.2.2., de la següent manera:

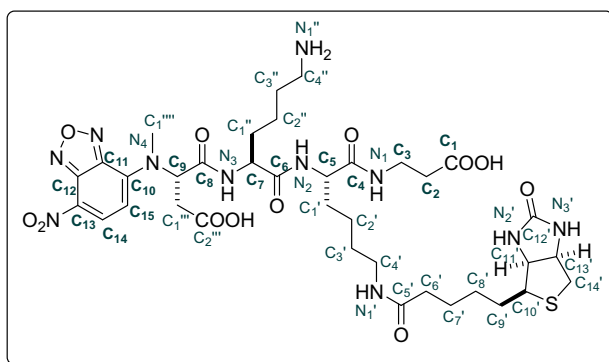
Aminoàcids protegits: Fmoc-βAla-OH (1.38 g, 4.45 mmol), Fmoc-Lys(Boc)-OH (0.63 g, 1.35 mmol), Fmoc-Lys(Biotin)-OH (0.80 g, 1.35 mmol), NBD-Me-Asp(OtBu)-OH (0.49 g, 1.35 mmol).

Resina: Nova PEG Wang resin (500 mg).

Reactius per a l'acoblament dels aminoàcids: DIEA (462 μL, 2.7 mmol), HATU (0.51 g, 1.35 mmol).

El desancoratge del pèptid té lloc per tractament de la peptidil-resina amb el mètode descrit a l'apartat 7.1.2.2.7.

Un cop purificat mitjançant HPLC, el pèptid resultant es va obtenir en un 15% de rendiment (58.1 mg).



6

Sòlid taronja. Puresa 99.5%, RP-HPLC Analític $t_R = 22.9$ min (gradient lineal de 10% de B durant 2 min, llavors de 10% a 20% de B en 5 min i finalment del 20% al 50% de B en 25 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **RP-HPLC Preparatiu** $t_R = 37.6$ min (isocràtic de 39% de B en 52 min; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 477 nm), **RMN de 1H** (500 MHz, DMSO), **RMN de ^{13}C** (100 MHz, DMSO):

Taula 7.4. Caracterització per RMN del pèptid NBD-D(MeK)K(Biotin)βA-OH (6).							
C nom	¹³ C desplaçament químic	H nom	¹ H desplaçament químic	Multiplicitat	Integració	Constant d'acoblament	
						J1	J2
C1	171.6						
C2	33.6	H2	2.35	t	2	7	
C3	34.7	H3	3.28-3.23	m	2		
C4	171.3						
C5	52.5	H5	4.11-4.14	m	1		
C6	170.7						
C7	52.5	H7	4.29-4.32	m	1		
C8	167.5						
C9	61.4	H9	6.01	t	1		
C10	121.7						
C11	144.9						
C12	146.7						
C13	144.5						
C14	136.2	H14	8.54	d	1	9.2	
C15	103.4	H15	6.51	d	1	9.2	
C1'	31.6	H1'a	1.41-1.56	m	1		
		H1'b	1.57-1.72	m	1		
C2'	22.6	H2'	1.12-1.40	m	2		
C3'	28.8	H3'	1.12-1.40	m	2		
C4'	38.2	H4'	2.98	dt	2	6.0	6.8
C5'	171.8						
C6'	35.1	H6'	2.04	t	2	7.4	
C7'	25.2	H7'	1.41-1.56	m	2		
C8'	28.1	H8'	1.12-1.40	m	2		
C9'	27.9	H9'a	1.41-1.56	m	1		
		H9'b	1.57-1.72	m	1		
C10'	55.3	H10'	3.06-3.11	m	1		
C11'	61.0	H11'	4.11-4.14	m	1		
C12'	162.6						
C13'	59.2	H13'	4.29-4.32	m	1		
C14'	39.7	H14'a	2.57	d	1	12.2	
		H14'b	2.82	dd	1	12.2	5.2
C1''	30.8	H1''a	1.41-1.56	m	1		
		H1''b	1.57-1.72	m	1		
C2''	22.1	H2''	1.12-1.40	m	2		
C3''	26.4	H3''	1.41-1.56	m	2		
C4''	38.7	H4''	2.67-2.78	m	2		

Taula 7.4. Caracterització per RMN del pèptid NBD-D(Me)KK(Biotin)βA-OH (6).							
C nom	¹³ C desplaçament químic	H nom	¹ H desplaçament químic	Multiplicitat	Integració	Constant d'acoblament	
						J1	J2
C1'''	36.4	H1'''a	2.86	dd	1	16.8	7.2
		H1'''b	3.15	dd	1	16.8	7.2
C2'''	171.3						
C1''''	36.4	H1''''	3.23	s	3		
N1			7.88	t	1	5.6	
N2			7.81	d	1	8.0	
N3			8.41	d	1	8.0	
N1'			7.46-7.76	m	1		
N2'			7.46-7.76	m	1		
N3'			7.46-7.76	m	1		
N1''							

HRMS (+ESI): m/z calculat per a $C_{36}H_{54}N_{11}O_{12}S$ $[M + H]^+$ 864.3674, trobat 864.3698, (-ESI): m/z calculat per a $C_{36}H_{52}N_{11}O_{12}S$ $[M - H]^-$ 862.3518, trobat 862.3525.

7.1.2.2.12. Síntesi del pèptid 5-FAM-KK(Biotin)βA-OH (7)

La síntesi d'aquest pèptid es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat 7.1.2.2., de la següent manera:

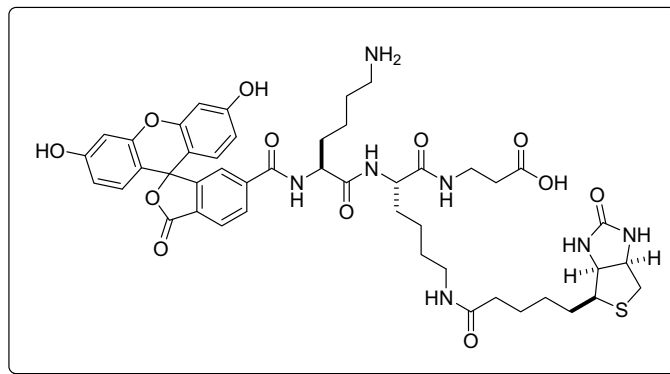
Aminoàcids protegits: Fmoc-βAla-OH (266 mg, 0.89 mmol), Fmoc-Lys(Boc)-OH (125 mg, 0.27 mmol), Fmoc-Lys(Biotin)-OH (160 mg, 0.27 mmol), 5-FAM-COOH (102 mg, 0.27mmol)

Resina: Nova PEG Wang resin (100 mg).

Reactius per a l'acoblament dels aminoàcids: DIEA (92 μL, 0.54 mmol), HATU (100 mg, 0.27 mmol).

El desancoratge del pèptid té lloc per tractament de la peptidil-resina amb el mètode descrit a l'apartat 7.1.2.2.7.

Un cop purificat mitjançant HPLC, el pèptid resultant es va obtenir en un 10% de rendiment (8.4 mg).



7

Sòlid groc. Puresa 99.4%, RP-HPLC Analític $t_R = 25.9$ min (gradient lineal de 10% de B durant 2 min, llavors de 10% a 25% de B en 5 min i finalment del 25% al 50% de B en 25 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 444nm), **RP-HPLC Preparatiu** $t_R = 27.7$ min (gradient de 40% a 67% de B en 40 min; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 477nm), **HRMS (+ESI):** m/z calculat per a $C_{46}H_{56}N_7O_{12}S$ $[M + H]^+$ 930.3708, trobat 930.3670, **(-ESI):** m/z calculat per a $C_{46}H_{54}N_7O_{12}S$ $[M - H]^-$ 928.3551, trobat 928.3602.

7.1.2.2.13. Síntesi del pèptid NBD-D(Me)KRA-OH (8)

La síntesi d'aquest pèptid es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat 7.1.2.2., de la següent manera:

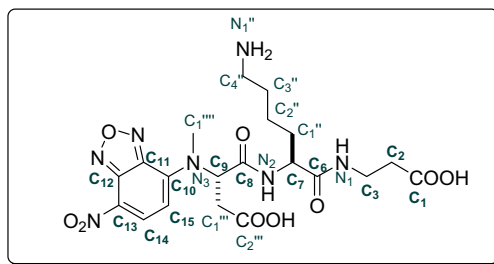
Aminoàcids protegits: Fmoc- β Ala-OH (798 mg, 2.67 mmol), Fmoc-Lys(Boc)-OH (375 mg, 0.81 mmol), NBD-Me-Asp(OtBu)-OH (282 mg, 0.81 mmol).

Resina: Nova PEG Wang resin (300 mg).

Reactius per a l'acoblament dels aminoàcids: DIEA (276 μ L, 1.62 mmol), HATU (300 mg, 0.81 mmol).

El desancoratge del pèptid té lloc per tractament de la peptidil-resina amb el mètode descrit a l'apartat 7.1.2.2.7.

Un cop purificat mitjançant HPLC, el pèptid resultant es va obtenir en un 19% de rendiment (25,8 mg).



8

Sòlid taronja. Puresa 99.7%, RP-HPLC Analític $t_R = 12.3-14.0$ min (gradient lineal de 10% de B durant 2 min, llavors de 10% a 90% de B en 28 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **RP-HPLC Preparatiu** $t_R = 24.8-30.7$ min (gradient lineal de 20% a 35% de B en 5 min, llavors isocràtic fins 45 min; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 477 nm), **RMN de ¹H** (400 MHz, D₂O) **RMN de ¹³C** (75 MHz, D₂O):

Taula 7.5. Caracterització per RMN del pèptid NBD-D(Me)KβA-OH (8).							
C nom	¹³ C desplaçament químic	H nom	¹ H desplaçament químic	Multiplicitat	Integració	Constant d'acoblament	
						J1	J2
C1	177.0						
C2	34.4	H2	2.62	t	2	6.3	
C3	36.2	H3	3.38-3.57	m	2		
C6	174.4						
C7	55.3	H7	4.34	dd	1	8.0	6.3
C8	171.5						
C9	62.9	H9	6.12-6.37	m	1		
C10	123.6						
C11	146.0						
C12	145.4						
C13	148.2						
C14	138.3	H14	8.49	d	1	9.1	
C15	105.7	H15	6.51	d	1	9.1	
C1''	31.3	H1''	1.71-1.88	m	2		
C2''	23.3	H2''	1.29-1.49	m	2		
C3''	27.3	H3''	1.65	quint.	2	7.5	
C4''	40.2	H4''	2.96	t	2	7.6	
C1'''	35.1	H1'''a	3.09	dd	1	17.1	7.3
		H1'''b	3.30	dd	1	17.1	7.3
C2'''	175.2						
C1''''	36.3	H1''''	3.34	s	3		

HRMS (+ESI): m/z calculat per a $C_{20}H_{28}N_7O_5$ $[M + H]^+$ 510.1949, trobat 510.1925, (-ESI): m/z calculat per a $C_{20}H_{26}N_7O_9$ $[M - H]^-$ 508.1792, trobat 508.1804.

7.1.2.2.14. Síntesi del pèptid NBD-D(Me) β A-OH (9)

La síntesi d'aquest pèptid es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat 7.1.2.2., de la següent manera:

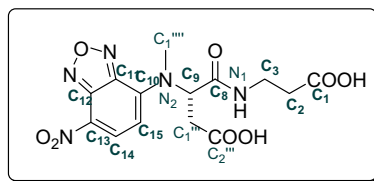
Aminoàcids protegits: Fmoc- β Ala-OH (798 mg, 2.67 mmol), NBD-Me-Asp(OtBu)-OH (282 mg, 0.81 mmol).

Resina: Nova PEG Wang resin (300 mg).

Reactius per a l'acoblament dels aminoàcids: DIEA (276 μ L, 1.62 mmol), HATU (300 mg, 0.81 mmol).

El desancoratge del pèptid té lloc per tractament de la peptidil-resina amb el mètode descrit a l'apartat 7.1.2.2.7.

Un cop purificat mitjançant HPLC, el pèptid resultant es va obtenir en un 14% de rendiment (19.0 mg).



9

Sòlid taronja. Puresa 99.2 %, **RP-HPLC Analític** t_R = 13.8 min (gradient lineal de 10% de B durant 2 min, llavors de 10 % a 90% de B en 28 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **RP-HPLC Preparatiu** t_R = 37.9 min (gradient lineal de 20% a 35% de B en 5 min, llavors isocràtic fins 45 min; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 477 nm), **RMN de 1H** (400 MHz, D_2O), **RMN de ^{13}C** (75 MHz, D_2O):

Taula 7.6. Caracterització per RMN del pèptid NBD-D(Me) β A-OH (9).

C nom	¹³ C desplaçament químic	H nom	¹ H desplaçament químic	Multiplicitat	Integració	Constant d'acoblament	
						J1	J2
C1	171.7						
C2	29.1	H2	2.61	t	2	6.3	
C3	31.4	H3a	3.48	dt	1	20.2	6.3
		H3b	3.59	dt	1	20.2	6.3
C8	166.0						
C9	57.9	H9	6.11-6.36	m	1		
C10	118.5						
C11	140.7						
C12	140.3						
C13	142.9						
C14	133.1	H14	8.55	d	1	9.1	
C15	100.5	H15	6.53	d	1	9.1	
C1'''	30.0	H1'''a	3.05	dd	1	17.0	7.4
		H1'''b	3.29	dd	1	17.0	7.4
C2'''	170.1						
C1''''	31.4	H1''''	3.30	s	3		

HRMS (+ESI): m/z calculat per a $C_{14}H_{16}N_5O_8$ $[M + H]^+$ 382.0999, trobat 382.1007, (-ESI): m/z calculat per a $C_{14}H_{14}N_5O_8$ $[M - H]^-$ 380.0842, trobat 380.0825.

7.1.2.2.15. Síntesis del pèptid DNP-GK β A-OH (10)

La síntesi d'aquest pèptid es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat 7.1.2.2., de la següent manera:

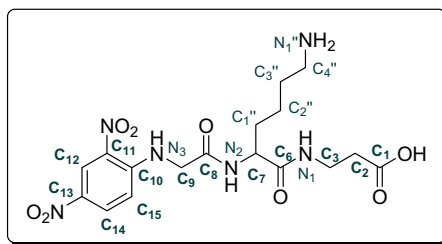
Aminoàcids protegits: Fmoc- β Ala-OH (798 mg, 2.67 mmol), Fmoc-Lys(Boc)-OH (375 mg, 0.81 mmol), Fmoc-Gly-OH (242 mg, 0.81 mmol), DNP-G-OH (195.3 mg, 0.81 mmols).

Resina: Nova PEG Wang resin (300 mg).

Reactius per a l'acoblament dels aminoàcids: DIEA (276 μ L, 1.62 mmol), HATU (300 mg, 0.81 mmol).

El desancoratge del pèptid té lloc per tractament de la peptidil-resina amb el mètode descrit a l'apartat 7.1.2.2.7.

Un cop purificat mitjançant HPLC, el pèptid resultant es va obtenir en un 13% de rendiment (15,3 mg).



10

Sòlid groc intens. Puresa 99.1%, RP-HPLC Analític $t_R = 15.2$ min (isocràtic de 10% de B durant 2 min, llavors de 10% a 90% de B en 28 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 351 nm), **RP-HPLC Preparatiu** $t_R = 35.7$ min (isocràtic de 20% de B durant 3 min, llavors gradient lineal de 20% a 80% durant 42 min; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 351 nm), **RMN de ^1H** (400 MHz, D_2O), **RMN de ^{13}C** (75 MHz, D_2O):

Taula 7.7. Caracterització per RMN del pèptid NBD-D(Me) β A-OH (9).							
C nom	^{13}C desplaçament químic	H nom	^1H desplaçament químic	Multiplicitat	Integració	Constant d'acoblament	
						J1	J2
C1	177.0						
C2	34.4	H2	2.60	t	2	6.4	
C3	36.2	H3	3.38-3.57	m	2		
C6	174.6						
C7	54.9	H7	4.33	dd	1	8.3	6.2
C8	171.6						
C9	46.5	H9	4.45-4.25	m	2		
C10	149.3						
C11	131.7	H11	6.90	d	1	9.6	
C12	125.3	H12	9.06	d	1	2.7	
C13	137.2						
C14	131.6	H14	8.29	d	1	9.5	
C15	115.8						
C1''	31.5	H1''	1.71-1.88	m	2		
C2''	23.1	H2''	1.29-1.49	m	2		
C3''	27.3	H3''	1.66	quint.	2	7.5	
C4''	39.1	H4''	2.97	t	2	7.7	

HRMS (+ESI): m/z calculat per a $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 441.1734, trobat 441.1721, (-ESI): m/z calculat per a $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_8$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 439.1577, trobat 439.1597.

7.1.3. Formació dels adductes

7.1.3.1. Preparació dels tampons

El PBS utilitzat per a fer les reaccions va ser tampó fosfat 10 mM amb un 0.8% de NaCl per a fer les reaccions a pH 4.6, 7 i 11 i carbonat 0.2 M amb un 0.8% de solució salina també per a les reaccions a pH 11.

El tampó de pH 4.6 es va preparar dissolent 0.69 g de NaH_2PO_4 i en 50 mL de H_2O milliQ. 5 mL d'aquesta solució inicial es van dissoldre amb 50 mL d' H_2O MilliQ que contenia 200 mg de NaCl. Es va acabar d'ajustar al pH exacte amb NaOH i HCl 1 N.

Pel tampó de pH 7 es varen preparar dues solucions; Solució A (0.69 g NaH_2PO_4 en 50 mL d' H_2O MilliQ), Solució B (0.71 g Na_2HPO_4 en 50 mL d' H_2O MilliQ). En un matràs aforat de 50 mL es va afegir 1 mL de la solució A i 1.5 mL de la solució B, i finalment es va enrasar amb H_2O MilliQ. Es van afegir 200 mg de NaCl i es va ajustar el pH a 7.0 amb NaOH i HCl 1 N.

Pel tampó de pH 11 es van prepara dues solucions; Solució A (0.69 g de NaH_2PO_4 en 50 mL de H_2O MilliQ), Solució B (1.2 g de K_3PO_4 en 50 mL d' H_2O MilliQ). En un matràs aforat de 50 mL es van afegir 2 mL de la solució A i 0.5 mL de la solució B, i finalment es va enrasar amb H_2O MilliQ. Es van afegir 200 mg de NaCl i es va ajustar el pH a 11.0 amb NaOH i HCl 1 N.

El tampó de pH 11 de sals de carbonat es va preparar dissolent 100 mg de NaCl en 10 mL d'una dissolució de carbonat 0.2 M (0.53 g de Na_2CO_3), enrasant a 25 mL. Es va acabar d'ajustar al pH desitjat amb NaOH i HCl 1 N.

7.1.3.2. Optimització de la reacció a escala analítica

Per a trobar les millors condicions de reacció de formació dels adductes es va utilitzar el pèptid NBD-D(Me)KK(Biotin) β A-OH (0.5 mg, 0.6 μmols), el qual es va dissoldre en PBS 10 mM (1.2 mL) a pH 7. Tot seguit es van afegir diferents equivalents d'amoxicil·lina. Les reaccions es van agitar durant 5 dies, a $T = 37^\circ\text{C}$ i sota atmosfera d'argó. Cadascuna d'elles es va seguir cada dia per HPLC. Simultàniament es van preparar blancs d'amoxicil·lina i pèptid, l'evolució de les quals també es va seguir per HPLC. A la **Taula 7.8.** s'observa el total de combinacions que es van provar.

Taula 7.8. Reaccions d'optimització dels equivalents d'amoxicil·lina necessaris.		
Reacció	[Amoxicil·lina](mM)	[Pèptid](mM)
R1	0.5	0.5
R2	0.5	0
R3	2.5	0.5
R4	2.5	0
R5	5	0.5
R6	5	0
R7	12.5	0.5
R8	12.5	0
R9	0	0.5
R10	0	0

Les millors condicions per realitzar la síntesis dels adductes van ser utilitzar 0,5 mM de la sonda peptídica amb 5 mM d'amoxicil·lina durant 4 dies de reacció.

7.1.3.3. Procediment general a escala semipreparativa

La sonda peptídica (5.8 μ mol) es va dissoldre en PBS 10 mM (5.8 mL) a 3 pHs diferents (4.6, 7, 11) i en tampó carbonat 0.2 M pH 11. Tot seguit, es van afegir 10 equivalents d'amoxicil·lina (21.1 mg, 0.058 mmol). La reacció es va agitar durant 4 dies, a T = 37 °C i sota atmosfera d'argó. La reacció es va seguir cada dia per HPLC, utilitzant gradients lineals dels dissolvents A: H₂O-0.1 % TFA i B: MeOH, i un flux de 1 mL/min. La detecció es va realitzar per UV a 479 nm. Simultàniament, blancs de pèptid a diferents pHs es van preparar i seguir la seva evolució per HPLC. A la **Taula 7.9**, s'observa el total de combinacions que es van provar.

Taula 7.9. Reaccions realitzades en la preparació dels adductes d'amoxicil·lina.			
Reacció	Pèptid	[Amoxicil·lina](mM)	pH
R1	6	5	4.6
R2	6	0	4.6
R3	6	5	7
R4	6	0	7
R5	6	5	11 (PBS)
R6	6	0	11 (PBS)
R7	6	5	11 (carbonat)
R8	6	0	11 (carbonat)
R9	7	5	4.6
R10	7	0	4.6
R11	7	5	7
R13	7	0	7
R14	7	5	11 (PBS)
R15	7	0	11 (PBS)

Després de seguir la reacció durant 4 dies, es va observar l'aparició de 3 adductes, dos a pH 4.6 i un a pH 11 per a cadascun dels pèptids utilitzats.

7.1.3.3.1. Separació dels adductes per cromatografia líquida d'alta eficàcia

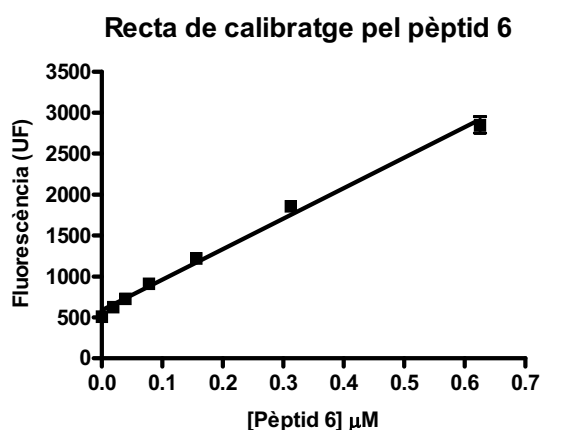
Els adductes es van purificar en condicions preparatives per HPLC en fase reversa. Les mostres es van eluir a un flux de 8 mL/min, utilitzant gradients lineals dels dissolvents A: H₂O-0.1 % TFA i B: MeOH. La detecció es va realitzar per UV a $\lambda = 479$ nm. També es va seguir per UPLC-MS, amb un flux de 0.3 mL/min utilitzant gradients lineals de dissolvents A: MeOH i B: H₂O-0.1% àcid fòrmic. Els adductes obtinguts es van liofilitzar. Seguidament es van diluir en una quantitat d'aigua coneguda i finalment es van aliquotar. A continuació, es mostra un resum dels 3 adductes obtinguts amb cadascuna de les dos sondes peptídiques utilitzades (vegeu la **Taula 7.10.**). L'adducte NKAx3 es va obtenir utilitzat tampons a pH 11 tant de fosfat com de carbonat.

Taula 7.10. Resum dels adductes obtinguts amb cadascuna de les sondes peptídiques utilitzades.

Nom de l'adducte	pH obtingut	Pèptid utilitzat
NKAx1	4,6	6
NKAx2	4,6	6
NKAx3	11 (fosfat)	6
NKAx3c	11 (carbonat)	6
FKAx1	4,6	7
FKAx2	4,6	7
FKAx3	11 (fosfat)	7

7.1.3.3.2. Determinació de la concentració dels adductes

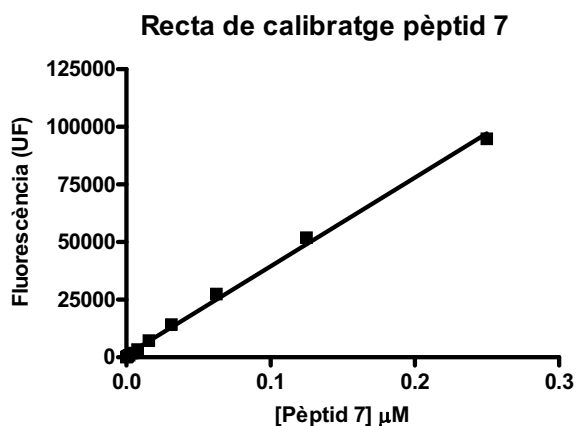
La concentració de cadascun dels adductes obtinguts es va determinar per fluorescència interpolant els valors en una recta de calibratge feta amb concentracions conegudes dels corresponents pèptids. En les **Taules 7.11.** i **7.12.** es descriuen les concentracions que es van obtenir pels 3 adductes obtinguts amb cadascuna de les dues sondes peptídiques (**6** i **7**).



$\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$, cutt off = 530 nm

Taula 7.11. Concentracions obtingudes pels tres adductes preparats amb la sonda peptídica 6.

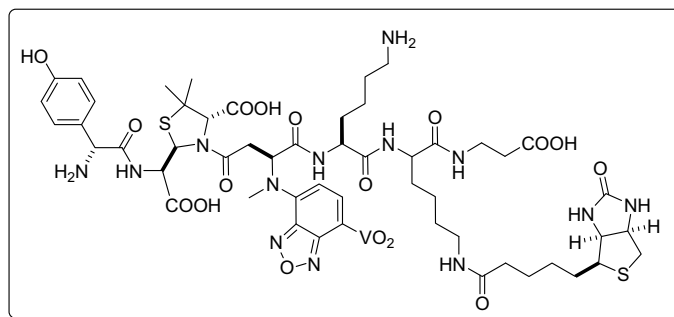
Nom de l'adducte	Batch	Concentració (µM)
NKAx1	1	126
	2	47
	3	450
NKAx2	1	22
	2	103
	3	255
NKAx3	1	2
	2	336
	3	73
NKAx3c	3	145



Taula 7.12. Concentracions obtingudes pels tres adductes preparats amb la sonda peptídica 7.

Nom de l'adducte	Concentració (μM)
FKAx1	10
FKAx2	20
FKAx3	4

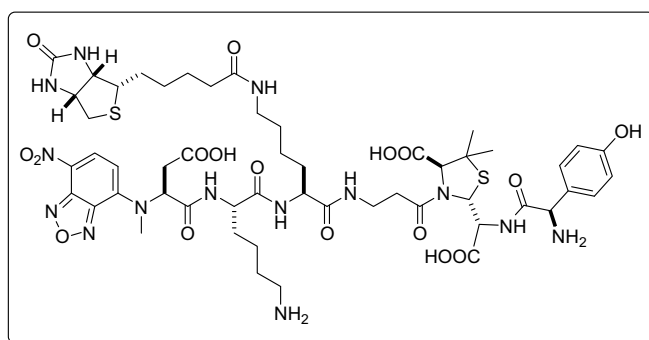
7.1.3.3.3. Adducte NKAx1 (11)



11

Sòlid taronja. Conversió de l'adducte 20.4 %, η (rendiment) 19.6 %, Puresa 99.3 %, RP-HPLC Analític t_R = 21.9 min (gradient lineal de 10% de B durant 2 min, llavors de 10% a 20% de B en 5 min i finalment del 20% al 50% de B en 25 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), RP-HPLC Preparatiu t_R = 25.3 min (gradient de 20% a 40% de B durant 5 min i llavors de 40% a 55% de B en 40 min; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 479 nm), HRMS: (+ESI): m/z calculat per a $C_{52}H_{73}N_{14}O_{17}S_2$ $[M + H]^+$ 1229.4720, trobat 1229.4655, (-ESI): m/z calculat per a $C_{52}H_{71}N_{14}O_{17}S_2$ $[M - H]^-$ 1227.4563, trobat 1227.4573.

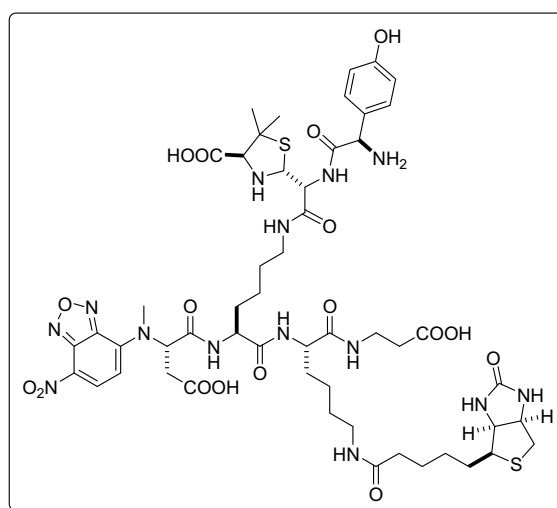
7.1.3.3.4. Adducte NKAx2 (12)



12

Sòlid taronja. Conversió de l'adducte 8.9 %, η (rendiment) 8.1%, Puresa 99.2 %, RP-HPLC Analític t_R = 26.1 min (gradient lineal de 10% de B durant 2 min, llavors de 10% a 20% de B en 5 min i finalment del 20% al 50% de B en 25 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), RP-HPLC Preparatiu t_R = 32.4 min (gradient de 20% a 40% de B durant 5 min i llavors de 40% a 55% de B en 40 min; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 479 nm), HRMS: (+ESI): m/z calculat per a $C_{52}H_{73}N_{14}O_{17}S_2$ $[M + H]^+$ 1229.4720, trobat 1229.4673, (-ESI): m/z calculat per a $C_{52}H_{71}N_{14}O_{17}S_2$ $[M - H]^-$ 1227.4563, trobat 1227.4508.

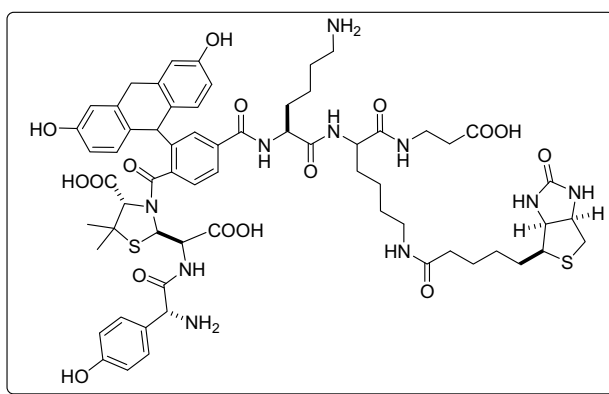
7.1.3.3.5. Adducte NKAx3 (13)



13

Sòlid taronja. Conversió de l'adducte 1.1%, **η (rendiment)** 0.8%, **Puresa** 99.3%, **RP-HPLC Analític** $t_R = 30.2$ min (gradient lineal de 10% de B durant 2 min, llavors de 10% a 20% de B en 5 min i finalment del 20% al 50% de B en 25 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **RP-HPLC Preparatiu** $t_R = 45.1$ min (gradient de 20% a 40% de B durant 5 min i llavors de 40% a 55% de B en 40 min; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **HRMS:** (+ESI): m/z calculat per a $C_{52}H_{73}N_{14}O_{17}S_2$ $[M + H]^+$ 1229.4720, trobat 1229.4620, (-ESI): m/z calculat per a $C_{52}H_{71}N_{14}O_{17}S_2$ $[M - H]^-$ 1227.4563, trobat 1227.4545.

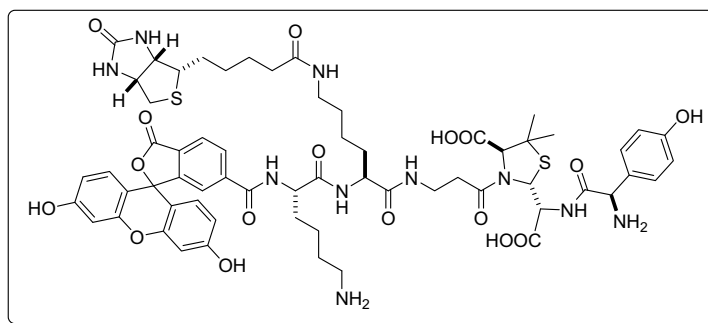
7.1.3.3.6. Adducte FKAx1 (14)



14

Sòlid groc. Conversió de l'adducte 17.2%, **η (rendiment)** 16.6%, **Puresa** 99.2%, **RP-HPLC Analític** $t_R = 21.5$ min (gradient lineal de 1% de B durant 2 min, llavors de 1% a 25% de B en 25 min i finalment del 25% al 50% de B en 25 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 444 nm), **RP-HPLC Preparatiu** $t_R = 24.6$ min (gradient de 40% a 67% de B durant 40 min; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 444 nm), **HRMS:(+ESI):** m/z calculat per a $C_{63}H_{79}N_{10}O_{16}S_2$ $[M + H]^+$ 1295.5117, trobat 1295.4756, (-ESI): m/z calculat per a $C_{63}H_{77}N_{10}O_{16}S_2$ $[M - H]^-$ 1293.4960, trobat 1293.4939.

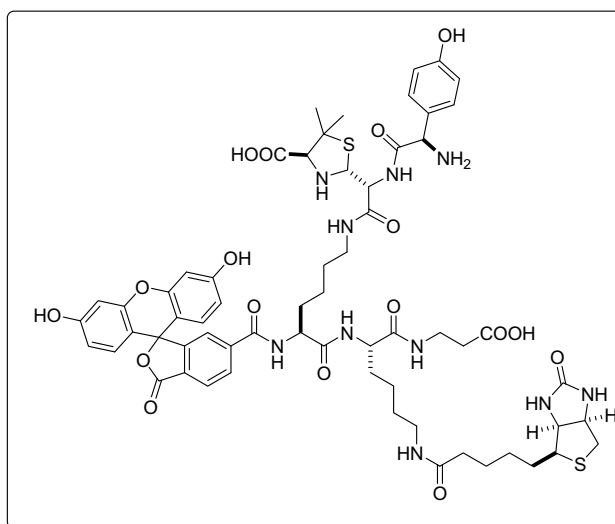
7.1.3.3.7. Adducte FKAx2 (15)



15

Sòlid groc. Conversió de l'adducte 4.4%, η (rendiment) 3.8%, Puresa 99.4%, RP-HPLC Analític t_R = 27.5 min (gradient lineal de 1% de B durant 2 min, llavors de 1% a 25% de B en 25 min i finalment del 25% al 50% de B en 25 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 444 nm), RP-HPLC Preparatiu t_R = 29.8 min (gradient de 40% a 67% de B durant 40 min; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 444nm), HRMS:(+ESI): m/z calculat per a $C_{63}H_{79}N_{10}O_{16}S_2$ $[M + H]^+$ 1295.5117, trobat 1295.4733, (-ESI): m/z calculat per a $C_{63}H_{77}N_{10}O_{16}S_2$ $[M - H]^-$ 1293.4960, trobat 1293.4685

7.1.3.3.8. Adducte FKAx3 (16)



16

Sòlid groc. Conversió de l'adducte 0.7%, **η (rendiment)** 0.2%, **Puresa** 99.5%, **RP-HPLC Analític** $t_R = 31.7$ min (gradient lineal de 1% de B durant 2 min, llavors de 1% a 25% de B en 25 min i finalment del 25% al 50% de B en 25 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 444 nm), **RP-HPLC Preparatiu** $t_R = 43.9$ min (gradient de 40% a 67% de B durant 40 min; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 444 nm), **HRMS:(+ESI):** m/z calculat per a $C_{63}H_{79}N_{10}O_{16}S_2$ $[M + H]^+$ 1295.5117, trobat 1295.4585, **(-ESI):** m/z calculat per a $C_{63}H_{77}N_{10}O_{16}S_2$ $[M - H]^-$ 1293.4960, trobat 1293.4669.

7.1.3.4. Elucidació estructural dels adductes. Simplificació estructural de les sondes peptídiques

Per tal d'elucidar l'estructura dels 3 possibles adductes obtinguts, es van sintetitzar els pèptids **6**, **7** i **8** i es van fer reaccionar amb l'amoxicil·lina en les mateixes condicions utilitzades pel pèptid NBD-D(Me)KK(Biotin) β A-OH a pH 4.6.

7.1.3.4.1. Formació de l'adducte utilitzant la sonda NBD-D(Me)K β A-OH (**8**)

Es va pesar el pèptid **8** (0.153 mg, 0.3 μ mol) i l'amoxicil·lina (1.096 mg, 3 μ mol), i es van dissoldre en 300 μ L de tampó a pH = 4.6. La reacció es va posar a l'estufa a 37 $^{\circ}$ C durant 5 dies. Es va seguir l'evolució per HPLC analític i UPLC-MS, observant-se dos pics amb la massa esperada.

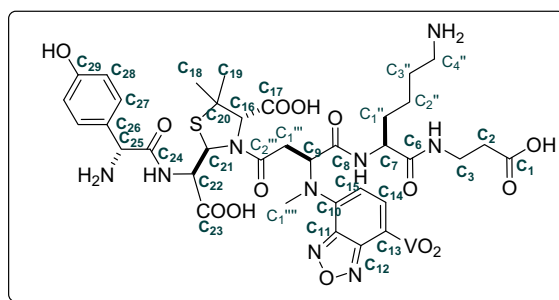
PIC I. RP-HPLC Analític $t_R = 15.0$ min (gradient lineal de 22% de B durant 20 min, llavors de 22% a 90% de B en 19 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **HRMS: (+ESI):** m/z calculat per a $C_{36}H_{47}N_{10}O_{14}S$ $[M + H]^+$ 875.2994, trobat 875.2975, **(-ESI):** m/z calculat per a $C_{36}H_{45}N_{10}O_{14}S$ $[M - H]^-$ 873.2837, trobat 873.2829.

PIC II. RP-HPLC Analític $t_R = 28.9$ min (gradient lineal de 22% de B durant 20 min, llavors de 22% a 90% de B en 19 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **HRMS: (+ESI):** m/z calculat per a $C_{36}H_{47}N_{10}O_{14}S$ $[M + H]^+$ 875.2994, trobat 875.2961, **(-ESI):** m/z calculat per a $C_{36}H_{45}N_{10}O_{14}S$ $[M - H]^-$ 873.2837, trobat 873.2816.

7.1.3.4.1.1. Escalat de la reacció

Es va pesar el pèptid **8** (5 mg, 9.8 µmols) i l'amoxicil·lina (35.8 mg, 98.2 µmols), i es van dissoldre en 10 mL de tampó a pH = 4.6. La reacció es va posar a l'estufa a 37 °C durant 5 dies i es va obtenir una barreja de productes que es van separar per HPLC preparatiu. Els productes aïllats es van caracteritzar per UPLC-MS. Es van identificar dos possibles adductes que es van tornar a purificar, es van liofilitzar i per últim i es van caracteritzar.

PIC I



17

Sòlid taronja. Conversió de l'adducte 11.6%, η (rendiment) 10.4%, Puresa 99.2%, RP-HPLC Analític $t_R = 15.0$ min (gradient lineal de 22% de B durant 20 min, llavors de 22% a 90% de B en 19 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **RP-HPLC Preparatiu** $t_R = 41.3$ min (isocràtic de 29% de B durant 40 min, gradient lineal de 29% a 35% durant 20 min, gradient lineal de 35% a 95% durant 5 min, isocràtic a 95% de B; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **RMN de 1H** (400MHz, D_2O), **RMN de ^{13}C** (75 MHz, D_2O):

Taula 7.13. Caracterització per RMN del PIC I (17)

C nom	^{13}C desplaçament químic	H nom	1H desplaçament químic	Multiplicitat	Integració	Constant d'acoblament	
C1	177.3						
C2	34.7	H2a	2.62-2.68	m	2		
		H2b	2.60-2.64	m	2		
C3	36.7	H3a	3.47-3.62	m	2		
		H3b	3.47	m	2		
C6	174.6						
C7	55.6	H7	4.39	dd	1	8.4	8.2
	55.5		4.29	dd	1	5.6	5.4
C8	171.6						
	171.4						
C9	62.7	H9	6.17	s	1		
			5.90	s	1		

Taula 7.13. Caracterització per RMN del PIC I (17).							
C nom	¹³ C desplaçament químic	H nom	¹ H desplaçament químic	Multiplicitat	Integració	Constant d'acoblament	
C10	124.7						
C11	146.5						
	146.4						
C12	146.0						
	145.8						
C13	148.8						
	148.4						
C14	136.8	H14	8.43-8.69	m	2		
	136.6						
C15	106.6	H15	6.56	d	1	8.6	
	106.1		6.45	d	1	8.6	
C1''	31.7	H1''	1.74-1.88	m	2		
	31.5		1.62-1.75	m	2		
C2''	23.6	H2''	1.28-1.39	m	4		
	23.5						
C3''	27.6	H3''	1.54-1.67	m	4		
	27.5						
C4''	40.5	H4''	2.86-3.03	m	4		
	40.4						
C1'''	34.8	H1'''a	3.12	dd	2		
		H1'''b	2.85	dd	2	19.5	5.1
C2'''	173.7						
C1''''	36.7	H1''''	3.31	s	3		
			3.15	s	3		
C16	84.9	H16	4.44	s	1		
	84.9		4.16	s	1		
C17	176.0						
	173.4						
C18	34.3	H18	1.38	s	3		
	33.7		1.34	s	3		
C19	26.8	H19	1.72	s	3		
	26.6		1.74	s	3		
C20	52.6						
	52.1						
C21	66.6	H21	5.63	d	1	4.3	
	64.8		5.52	d	1	8.6	
C22	62.2	H22	5.30	d	1	4.3	
	57.5		5.04	d	1	8.6	

Taula 7.13. Caracterització per RMN del PIC I (17).

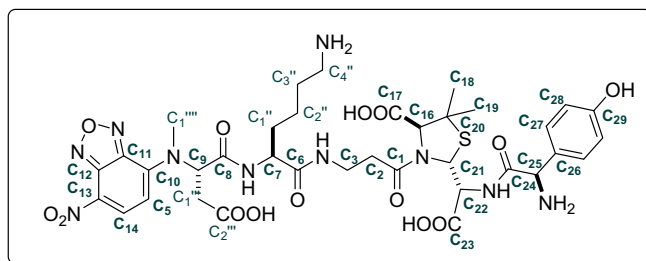
C nom	¹³ C desplaçament químic	H nom	¹ H desplaçament químic	Multiplicitat	Integració	Constant d'acoblament	
						J1	J2
C23	174.8						
	173.7						
C24	170.5						
	169.9						
C25	57.5	H25	5.19	s	1		
	57.2		5.15	s	1		
C26	124.1						
	124.5						
C27	131.1	H27	7.29	d	2	8.3	
	131.1		7.25	d	2	8.2	
C28	117.9	H28	6.89	d	2	7.5	
	117.5		6.78	d	2	8.1	
C29	158.9						
	158.5						

HRMS: (+ESI): m/z calculat per a $C_{36}H_{47}N_{10}O_{14}S$ [$M + H$]⁺ 875.2994, trobat 875.2957, (-ESI): m/z calculat per a $C_{36}H_{45}N_{10}O_{14}S$ [$M - H$]⁻ 873.2837, trobat 873.2826.

S'observa duplictat en els pics a causa dels dos estereoisòmers que apareixen com a conseqüència del bloqueig del nitrogen terciari de l'anell tiazolidínic de l'amoxicil·lina. Per ressonància s'observa que els dos isòmers es troben en una proporció 1:1.

Els carbonis que presenten un desplaçament diferent a l'esperat són el C10, C14, C15, C2''', C18, C19 i el C20. Per aquest motiu es proposa l'estructura **17** com a possible adducte.

PIC II



18

Sòlid taronja. Conversió de l'adducte 7.2%, η (rendiment) 6.7%, Puresa 99.3%, RP-HPLC Analític t_R = 28.9 min (gradient lineal de 22% de B durant 20 min, llavors de 22% a 90% de

B en 19 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **RP-HPLC Preparatiu** $t_r = 68.4$ min (isocràtic de 29% de B durant 40 min, gradient lineal de 29% a 35% durant 20 min, gradient lineal de 35% a 95% durant 5 min, isocràtic a 95% de B; flux de 8 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **RMN de ^1H** (400MHz, D_2O), **RMN de ^{13}C** (75MHz, D_2O):

Taula 7.14. Caracterització per RMN del PIC II (18).						
C nom	^{13}C desplaçament químic	H nom	^1H desplaçament químic	Multiplicitat	Integració	Constant d'acoblament
C1	175.4					
C2	34.6	H2a	2.14-2.32	m	2	
		H2b	1.95-2.13	m	2	
C3	35.6	H3a	3.10-3.32	m	2	
		H3b	3.12	m	2	
C6	173.5					
C7	54.4	H7	4.23-4.38	m	1	
			4.27-4.38	m	1	
C8	171.3					
C9	62.7	H9	6.25	s	1	
			6.05	s	1	
C10	123.4					
C11	145.7					
C12	145.3					
C13	147.1					
C14	138.0	H14	8.61	d	1	8.9
			8.60	d	1	
C15	105.5	H15	6.59	d	2	8.8
C1''	30.8	H1''a	1.73-1.87	m	2	
		H1''b	1.63-1.72	m	2	
C2''	22.7	H2''a	1.28-1.32	m	2	
		H2''b	1.29-1.32	m	2	
C3''	26.8	H3''a	1.56-1.71	m	2	
	30.8	H3''b	1.73-1.78	m	2	
C4''	39.7	H4''a	2.87-2.99	m	2	
		H4''b	2.92-3.02	m	2	
C1'''	30.7	H1'''a	3.03-3.12	m	2	
		H1'''b	3.23-3.37	m	2	
C2'''	174.2					
C1''''	36.9	H1''''	3.36	s	6	
	34.8					

Taula 7.14. Caracterització per RMN del PIC II (18).

C nom	¹³ C desplaçament químic	H nom	¹ H desplaçament químic	Multiplicitat	Integració	Constant d'acoblament
C16	76.3	H16	4.21	s	1	
			4.14	s	1	
C17	175.0					
C18	32.7	H18	1.42	s	6	
C19	25.6	H19	1.33	s	6	
C20	52.1					
C21	64.6	H20	5.59	d	1	5.7
			5.37	d	1	9.1
C22	62.2	H22	5.10	d	1	5.7
	57.5		5.00	d	1	
C23	173.5					
C24	169.5					
C25	56.6	H25	5.26	s	1	
			5.20	s	1	
C26	124.0					
C27	130.7	H27	7.41	d	2	8.6
	130.6		7.31	d	2	8.2
C28	117.5	H28	6.96	d	2	8.6
			6.81	d	2	
C29	158.0					

HRMS: (+ESI): m/z calculat per a $C_{36}H_{47}N_{10}O_{14}S$ $[M+H]^+$ 875.2994, trobat 875.301, (-ESI): m/z calculat per a $C_{36}H_{45}N_{10}O_{14}S$ $[M-H]^-$ 873.2837, trobat 873.2837.

S'observa duplictat en els pics a causa dels dos estereoisòmers que apareixen com a conseqüència del bloqueig del nitrogen terciari de l'anell tiazolidínic de l'amoxicil·lina. Per ressonància s'observa que els dos isòmers es troben en una proporció 3:1.

Els carbonis que presenten un desplaçament diferent a l'esperat són el C1, C16, C18, C19, C20, i C22. També presenten desplaçaments diferents els protons H2 i H3. Per aquest motiu es proposa l'estructura **18** com la més probable per aquest adducte.

7.1.3.4.2. Formació de l'adducte utilitzant la sonda NBD-D(Me) β A-OH (9)

Es va pesar el pèptid **9** (0.11 mg, 0.3 μ mol) i l'amoxicil·lina (1.096 mg, 3 μ mol) i es van dissoldre en 300 μ L de buffer a pH=4.6. Es va posar a l'estufa a 37 °C durant 5 dies. Es va seguir la reacció per HPLC analític i UPLC-MS. Es van observar dos pics amb la massa esperada.

PIC I. **RP-HPLC Analític** $t_R = 24.5$ min (gradient lineal de 22% de B durant 20 min, llavors de 22% a 90% de B en 19 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **HRMS:** (+ESI): m/z calculat per a $C_{30}H_{35}N_8O_{13}S$ $[M + H]^+$ 747.2183, trobat 747.2107, (-ESI): m/z calculat per a $C_{30}H_{33}N_8O_{13}S$ $[M - H]^-$ 745.1888, trobat 745.1888.

PIC II. **RP-HPLC Analític** $t_R = 28.4$ min (gradient lineal de 22% de B durant 20 min, llavors de 22% a 90% de B en 19 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479 nm), **HRMS:** (+ESI): m/z calculat per a $C_{30}H_{35}N_8O_{13}S$ $[M + H]^+$ 747.2004, trobat 747.2027, (-ESI): m/z calculat per a $C_{30}H_{33}N_8O_{13}S$ $[M - H]^-$ 745.1888, trobat 745.1909.

7.1.3.4.3. Formació de l'adducte utilitzant la sonda DNP-GK β A-OH (10)

Es va pesar el pèptid **10** (0.242 mg, 0.3 μ mols) i l'amoxicil·lina (1.096 mg, 3 μ mols) i es van dissoldre en 300 μ L de buffer a pH=4.6. Es va posar a l'estufa a 37 $^{\circ}$ C durant 5 dies. Es va seguir la reacció per HPLC analític i UPLC-MS. Es van observar dos pics amb la massa esperada.

PIC I. **RP-HPLC Analític** $t_R = 18.7$ min (gradient lineal de 10% de B durant 2 min, llavors de 10% a 90% de B en 28 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 351 nm), **HRMS:** (+ESI): m/z calculat per a $C_{33}H_{43}N_9O_{13}S$ $[M + H]^+$ 806.2779, trobat 806.2797, (-ESI): m/z calculat per a $C_{33}H_{41}N_9O_{13}S$ $[M - H]^-$ 804.2623, trobat 804.2627.

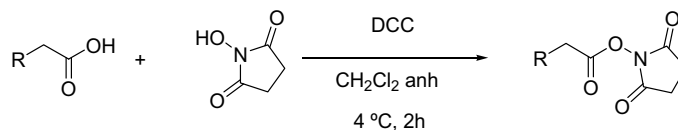
7.1.4. Síntesi dels haptens

7.1.4.1. Síntesi dels braços espaciadors provinents de l'àcid acètic

7.1.4.1.1. Procediment general

Es van dissoldre el derivat de l'àcid acètic (4 mmols) i la NHS (472 mg, 4.1 mmols) en CH_2Cl_2 (6 mL), i seguidament es va afegir DCC (846 mg, 4.1 mmols) dissolta en CH_2Cl_2 (4 mL). La reacció es va agitar durant 2 hores a 4 $^{\circ}$ C i 1 hora a temperatura ambient. Es va observar l'aparició d'un precipitat blanc. El sòlid es va separar per filtració i el dissolvent es va evaporar al buit. El residu resultant es va dissoldre en AcOEt calent. Va aparèixer un precipitat residual que també es va separar per filtració i es va evaporar al buit. El producte es va purificar per

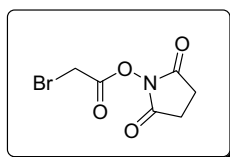
precipitació en $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Et}_2\text{O}$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$ [202]. El sòlid es va filtrar i assecar al buit. Els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 7.15.**:



Taula 7.15. Rendiments obtinguts en la síntesi dels braços espaciadors.

Reacció	R1	Rendiment (%)
1	I	70
2	Br	78

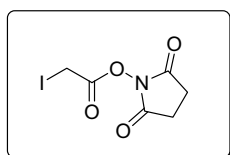
Bromoacetat de la *N*-hidroxisuccinimida (N-SBr) (19)



19

Sòlid blanc. IR (Br): 3498, 3056, 2993, 2937, 2651, 1811, 1780, 1736, 1437, 1423, 1406, 1355, 1298, 1260, 1210, 1153, 1073, 1047. **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ 4.10 (2H, s, BrCH_2), 2.86 (4H, s, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 163.1, 25.7, 21.3.

Iodoacetat de *N*-hidroxisuccinimida (N-SI) (20)



20

Sòlid groc. IR (KBr): 3493, 3057, 2992, 2937, 1807, 1775, 1736, 1419, 1364, 1352, 1294, 1256, 1208, 1151, 1066, 1045. **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ 3.94 (2H, s, ICH_2), 2.86 (4H, s, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ 168.8, 164.8, 25.8, -12.5.

7.1.4.2. Síntesi del 3-maleimidopropanoat de succinimida

Es va dissoldre anhídrid maleic (1 g, 10 mmols) en DMF anh. (10 mL). Seguidament, es va afegir β -alanina (0.91 g, 10 mmols). La suspensió resultat es va agitar durant 1 hora a temperatura ambient fins a la seva total redissolució. Es va refredar a 0 °C en un bany de gel i es va addicionar NHS (1.45 g, 12.6 mmol) i DCC (4,2 g, 20.3 mmol) en 10 mL de DMF anh.

Al cap de 5 minuts, es va augmentar la temperatura fins a temperatura ambient i es va agitar durant 4 hores. Es va observar l'aparició d'un precipitat blanc.

El cru de reacció es va filtrar i a la solució resultant es va afegir H_2O i CH_2Cl_2 . La fase orgànica es va assecar amb MgSO_4 anh., es va filtrar i es va evaporar el dissolvent. Es va obtenir un sòlid blanc que es va purificar per precipitació amb CH_2Cl_2 i Et_2O [203]. Es van obtenir 0.811 g (30% de rendiment) del producte desitjat.

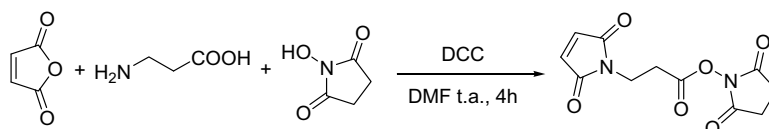
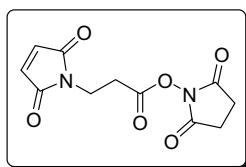


Figura 7.1. Esquema sintètic per a l'obtenció del braç espaiador 3-maleimidopropanoat de succinimida.

Maleimidopropionat de *N*-hidroxisuccinimida (N-SMP) (21)



21

Sòlid blanc. IR (KBr): 3459, 3327, 3166, 3108, 2929, 2850, 1826, 1783, 1719, 1626, 1581, 1446, 1433, 1407, 1384, 1329, 1315, 1212, 1149, 1072. **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ 6.71 (2H, s, COCHCHCO), 3.90 (2H, t, $J=7.2$, NCH_2CH_2), 2.99 (2H, t, $J=7.2$, NCH_2CH_2), 2.79 (4H, s,

COCH₂CH₂CO). **RMN de ¹³C** (100 MHz, CDCl₃) δ170.27, 168.93, 166.18, 134.49, 33.17, 29.91, 25.74. **HRMS** (+ESI): *m/z* calculat per a C₁₁H₁₀N₂O₆Na [M + Na]⁺ 289.0437, trobat 289.0446.

7.1.4.3. Síntesi dels dímers penicil·línics

7.1.4.3.1. Síntesi del 4,4'-ditiodibutiroat de succinimida (22)

Es va dissoldre l'àcid 4,4'-ditiodibutíric (500 mg, 2 mmols) en dioxà anhidre (10 mL). Es va afegir gota a gota NHS (500 mg, 4.4 mmols) en dioxà anh. (6 mL) i DCC (900 mg, 4.4 mmols) en dioxà anh. (4 mL) i es va agitar durant 4 hores a temperatura ambient. Es va observar l'aparició d'un sòlid blanc. Es va filtrar i es va evaporar el dissolvent al buit. Es va purificar per cristal·lització amb acetona:Et₂O (1:1) a temperatura ambient. Es van obtenir 0.626 mg (73 %) del 4,4'-ditiodibutiroat de succinimida [215].

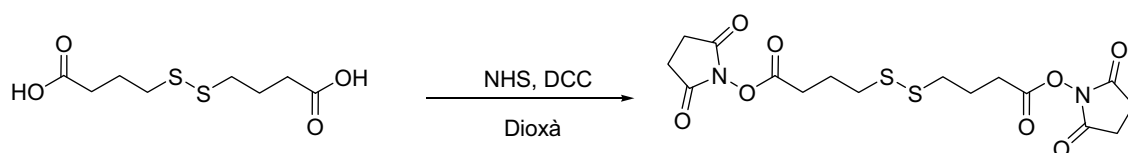
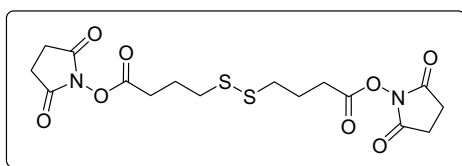


Figura 7.2. Esquema sintètic per a l'obtenció del braç espaciador 4,4'-ditiodibutiroat de succinimida.



22

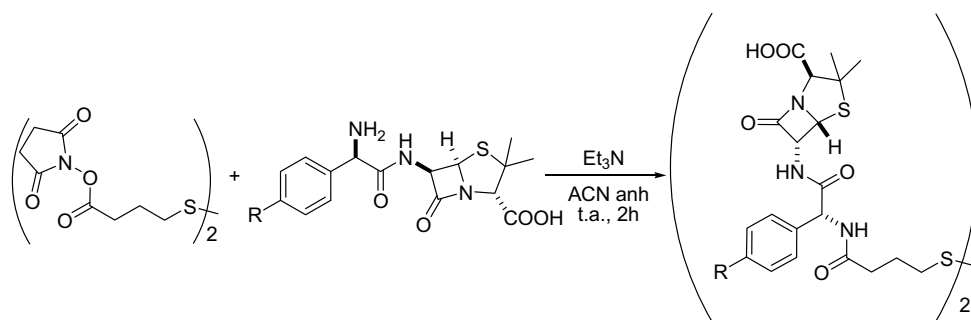
Sòlid blanc. IR (KBr): 3504, 3387, 2932, 2851, 1822, 1786, 1728, 1522, 1405, 1376, 1309, 1208, 1070, 1047. **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ 2.88-2.81 (8H, m, 2×(COCH₂CH₂CO)), 2,77 (8H, q, J = 8, 2×(OCOCH₂ + CH₂S)), 2.15 (4H, quint., J = 7, 2×(CH₂CH₂CH₂)). **RMN de ¹³C** (100 MHz, CDCl₃) δ169.2, 168.2, 36.9, 29.5, 25.7, 24.0. **HRMS** (+ESI): *m/z* calculat per a C₁₆H₂₁N₂O₈S₂ [M + H]⁺ 433.0739, trobat 433.0744.

7.1.4.3.2. Procediment general

Es va dissoldre la penicil·lina corresponent (1.5 mmols) en ACN (10 mL) i es va afegir Et₃N destil·lada (0.421 mL, 3mmols) fins observar una total dissolució de l'amoxicil·lina. Es va

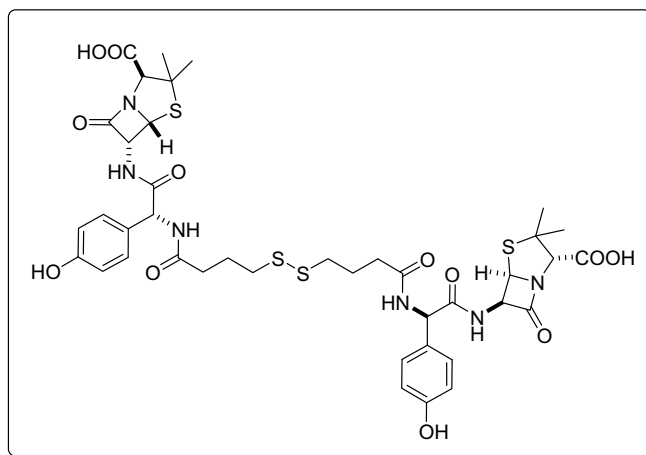
addicionar 4,4'-ditidibutiroat de succinimida (298.0 mg, 0.69 mmols), i la mescla resultant es va agitar durant 2 hores, sota atmosfera d'argó i a temperatura ambient.

La mescla de reacció es va diluir en una solució de NaHCO₃ saturada i es va rentar amb AcOEt. La fase aquosa es va acidificar fins a pH 3 amb HCl 1N i es va extraure amb AcOEt. La combinació de les fases orgàniques es va assecar amb MgSO₄ i evaporar al buit. Els resultats obtinguts es resumeixen en la següent **Taula**:



Taula 7.16. Rendiments obtinguts en les síntesis dels dímers penicil·línics.		
Reacció	R	Rendiment (%)
R1	H	64
R2	OH	53

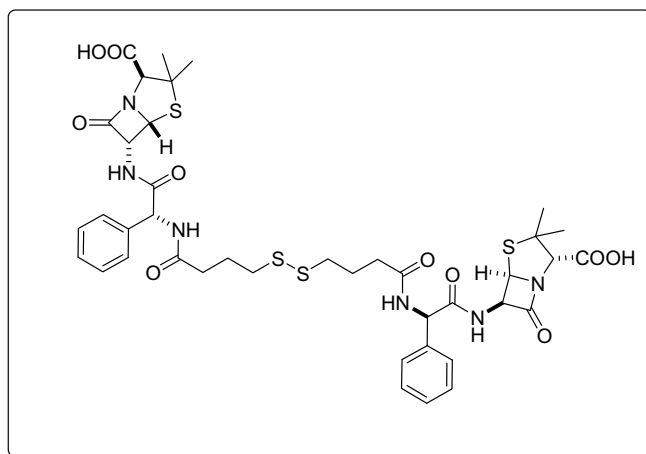
Àcid 6-(2-(4-((4-(2-(2-carboxi-3,3-dimetil-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-6-ylamino)-1-(4-hidroxifenil)-2-oxoetilamino)-4-oxobutil)disulfanil)butanamido)-2-(4-hidroxifenil) acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílic (dímer de l'amoxicil·lina) (23)



23

Sòlid groc pàlid. IR (KBr): 3328, 2968, 1732, 1646, 1514, 1449, 1372, 1217, 1130. **RMN de ^1H** (500 MHz, DMSO) δ 8.77 (2H, d, $J = 8$, $2\times(\text{CONHCHCH})$), 8.30 (2H, d, $J = 8$, $2\times(\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2)$), 7.19 (4H, d, $J = 8$, $2\times(\text{HOC}(\text{CHCH})_2)$), 6.69 (4H, d, $J = 8$, $2\times(\text{HOC}(\text{CHCH})_2)$), 5.53 (2H, d, $J = 8$, $2\times(\text{CHNHCOCH}_2\text{CH}_2)$), 5.51 (2H, dd, $J = 8$, $J = 4$, $2\times(\text{CONHCHCH})$), 5.40 (2H, d, $J = 4$, $2\times(\text{CONHCHCH})$), 4.20 (2H, s, CHCOOH), 2.68 (4H, t, $J = 7$, $2\times(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})$), 2.34-2.26 (4H, m, $2\times(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})$), 1.85 (4H, t, $J = 7$, $2\times(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})$), 1.56 (6H, s, $2\times(\text{CH}_3)$), 1.43 (6H, s, $2\times(\text{CH}_3)$). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, DMSO) δ 173.4, 171.1, 170.5, 168.7, 156.7, 128.4, 128.2, 114.8, 70.3, 67.2, 63.6, 58.0, 55.2, 37.3, 33.4, 30.3, 26.6, 24.8. **HRMS** (+ESI): m/z calculat per a $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 933.2291, trobat 933.2341, (-ESI): m/z calculat per a $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_4$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 931.2135, trobat 931.2215.

Àcid 6-(2-(4-((4-(2-(2-carboxi-3,3-dimetil-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-6-ylamino)-2-oxo-1-feniletilamino)-4-oxobutil)disulfanil)butanamido)-2-fenilacetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxilic (ampicillin dimer) (24)



24

Sòlid groc pàlid. IR (KBr): 3319, 2966, 1781, 1712, 1647, 1522, 1455, 1372, 1299, 1214, 1131, 1076. **RMN de ^1H** (500 MHz, DMSO) δ 8.95 (2H, d, $J = 9$, $2\times(\text{CONHCHCH})$), 8.46 (2H, d, $J = 8.5$, $2\times(\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2)$), 7.42 (4H, d, $J = 7.4$, $2\times(\text{CH}(\text{CHCH})_2)$), 7.32 (4H, t, $J = 7.3$, $2\times(\text{CH}(\text{CHCH})_2)$), 7.28 (2H, d, $J = 7.3$, $2\times(\text{CH}(\text{CHCH})_2)$), 5.70 (2H, d, $J = 6$, $2\times(\text{CHNHCOCH}_2\text{CH}_2)$), 5.52 (2H, dd, $J = 9$, $J = 3$, $2\times(\text{CONHCHCH})$), 5.39 (2H, d, $J = 3$, $2\times(\text{CONHCHCH})$), 4.21 (2H, s, CHCOOH), 2.68 (4H, t, $J = 12$, $2\times(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})$), 2.32 (4H, t, $J = 12$, $2\times(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})$), 1.85 (4H, quint., $J = 12$, $2\times(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})$), 1.55 (6H, s, $2\times(\text{CH}_3)$), 1.42 (6H, s, $2\times(\text{CH}_3)$). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, DMSO) δ 173.24, 171.26, 170.11, 168.80, 138.07, 128.11, 127.47, 127.13, 70.28, 67.20, 63.67, 58.15,

55.57, 37.27, 33.42, 30.42, 26.57, 24.80. **HRMS** (+ESI): m/z calculat per a $C_{40}H_{49}N_6O_{10}S_4$ $[M + H]^+$ 901.2393, trobat 901.2374, (-ESI): m/z calculat per a $C_{40}H_{47}N_6O_{10}S_4$ $[M - H]^-$ 899.2237, trobat 899.2268.

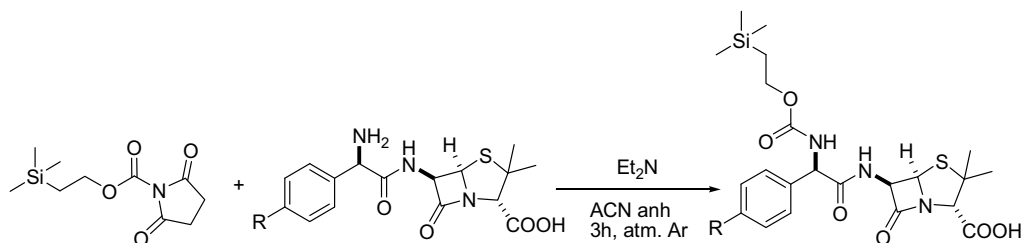
7.1.4.4. Derivatització de les aminopenicil·lines

7.1.4.4.1. Protecció del grup amino amb el grup protector Teoc

7.1.4.4.1.1. Procediment general

Es va dissoldre la corresponent aminopenicil·lina (2.25 mmols) en ACN anhidre (20 mL) i tot seguit es va afegir Et_3N (0.420 mL, 3 mmols). Als 5 minuts, es va afegir el 1-[2-(Trimetilsilil)etoxicarboniloxi]-pirrolidin-2,5-diona (583 mg, 2.25 mmols) i es va agitar la mescla de reacció durant 3 hores, a temperatura ambient, sota atmosfera d'Argó i protegit de la llum.

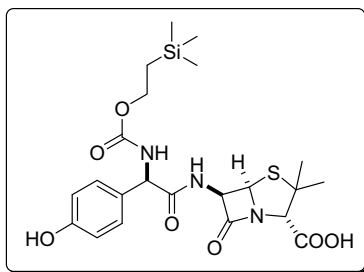
Es va evaporar el dissolvent i el residu restant es va dissoldre en una solució de $NaHCO_3$ saturat i $AcOEt$. La fase aquosa es va acidificar fins a pH 3, es va extraure amb $AcOEt$ i es va assecar al buit. Els resultats obtinguts s'observen a la **Taula 7.17.**:



Taula 7.17. Rendiments obtinguts en la protecció del grup amino de la penicil·lina amb el protector Teoc.

Reacció	R	Rendiment (%)
R1	H	85
R2	OH	90

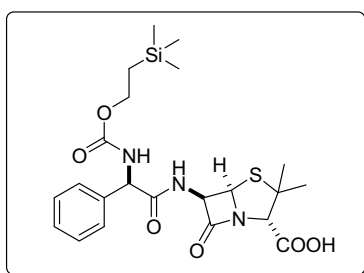
Àcid (2S,5R,6R)-6-((R)-2-(4-hidroxifenil)-2-((2-(trimetilsilil)etoxi)carbonilamino) acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-aza-biciclo[3.2.0]heptan-2-carboxílic (Teoc-Amx) (25)



25

Sòlid groc pàlid. IR (KBr): 3334, 2956, 1876, 1677, 1614, 1597, 1515, 1459, 1372, 1249, 1176, 1131, 1061. **RMN de ^1H** (500 MHz, DMSO) δ 8.60-8.80 (1H, m, NHCOCH), 7.35-7.45 (1H, m, NHCOO), 7.19 (2H, d, $J = 8.5$, $\text{HOC}(\text{CHCH})_2$), 6.68 (2H, d, $J = 8.5$, $\text{HOC}(\text{CHCH})_2$), 5.50 (1H, dd, $J = 8$, $J = 4$, CONHCHCH), 5.39 (1H, d, $J = 4$, CONHCHCH), 5.28 (1H, d, $J = 7.5$, CHNHCOO), 4.19 (1H, s, CHCOOH), 4.05 (2H, ddd, $J = 7$, $J = 4$, $J = 2.5$, $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 1.55 (3H, s, CH_3), 1.43 (3H, s, CH_3), 0.93 (2H, dd, $J = 7$, $J = 2.5$, $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.02 (9H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, DMSO) δ 173.3, 170.6, 168.7, 156.8, 155.6, 128.4, 128.1, 114.8, 70.3, 67.1, 63.5, 61.9, 58.0, 57.0, 30.2, 26.5, 17.4, -1.5. **HRMS** (-ESI): m/z calculat per a $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_7\text{SiS}$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$ 508.1576, trobat 508.1554.

Àcid (2S,5R,6R)-3,3-dimetil-7-oxo-6-((R)-2-fenil-2-((2-(trimetilsilil)etoxi)carbonilamino) acetamido)-4-tia-1-aza-biciclo[3.2.0]heptan-2-carboxílic (Teoc-Amp) (26)



26

Sòlid groc pàlid. IR (KBr): 3317, 2955, 1785, 1677, 1587, 1514, 1456, 1372, 1300, 1249, 1131, 1061. **RMN de ^1H** (300 MHz, DMSO) δ 8.90 (1H, d, $J = 6.4$, NHCOCH), 7.62 (1H, d, $J = 8.7$, NHCOO), 7.43 (2H, d, $J = 6.9$, $\text{CH}(\text{CHCH})_2$), 7.29 (3H, m, $\text{CH}(\text{CHCH})_2$), 5.51 (1H, dd, $J = 7.7$, $J = 4.1$,

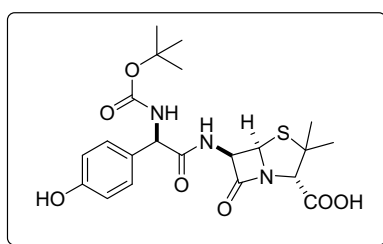
CONHCHCH)), 5.44 (1H, d, J = 8.7, CHNHCOO), 5.40 (1H, d, J = 4.1, CONHCHCH), 4.20 (1H, s, CHCOOH), 4.06 (2H, m, NHCOOCH₂CH₂Si), 1.54 (3H, s, CH₃), 1.41 (3H, s, CH₃), 0.93 (2H, m, NHCOOCH₂CH₂Si), 0.02 (9H, s, Si(CH₃)₃). **RMN de ¹³C** (75 MHz, DMSO) δ173.2, 170.1, 168.7, 155.6, 137.9, 128.4, 127.5, 127.1, 70.3, 67.1, 63.5, 62.0, 58.1, 57.4, 30.3, 26.5, 17.4, -1.5. **HRMS** (+ESI): *m/z* calculat per a C₂₂H₃₂N₃O₆SiS [M + H]⁺ 494.1781, trobat 494.1811 (-ESI): *m/z* calculat per a C₂₂H₃₀N₃O₆SiS [M - H]⁻ 492.1625, trobat 492.1654.

7.1.4.4.2. Protecció del grup amino amb el grup protector Boc

Es va dissoldre amoxicil·lina (548 mg, 1.5 mmols) en ACN (6 mL) i es va afegir Et₃N (0.420 mL, 3 mmols). Al cap de 5 minuts, es va afegir di-*tert*-butildicarbonat (0.35 mL, 1.5 mmols), i la reacció es va agitar a temperatura ambient durant 30 minuts.

La mescla es va dissoldre amb acetat d'etil i aigua. La fase aquosa es va acidificar fins pH 3 i es va extraure amb acetat d'etil. Finalment, es va assecar amb MgSO₄ anhidre i es va evaporar el dissolvent al buit. Es van obtenir 584 mg (84%) de l'amoxicil·lina protegida amb el grup Boc.

Àcid (2S,5R,6R)-6-((R)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-(4-hidroxifenil)acetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-aza-biciclo[3.2.0]heptan-2-carboxílic (Boc-Amx) (27)



27

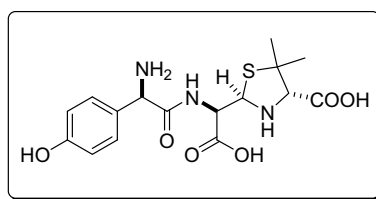
Sòlid groc pàlid. IR (KBr): 3339, 2977, 2933, 1777, 1677, 1615, 1515, 1457, 1393, 1369, 1233, 1162, 1052. **RMN de ¹H** (500 MHz, DMSO) δ 9.20-9.40 (1H, m, COOH), 8.65 (1H, d, J = 7.5, NHCOCH), 7.19 (2H, d, J = 8.5, HOC(CHCH)₂), 7.08-7.15 (1H, m, NHCOO^tBu), 6.68 (2H, d, J = 8.5, HOC(CHCH)₂), 5.51 (1H, dd, J = 7.5, J = 4, CONHCHCH), 5.40 (1H, d, J = 4, CONHCHCH), 5.23 (1H, m, CHNHCOO^tBu), 4.20 (1H, s, CHCOOH), 1.56 (3H, s, CH₃), 1.43 (3H, s, CH₃), 1.38 (9H, s, C(CH₃)₃). **RMN de ¹³C** (100 MHz, DMSO) δ173.3, 170.8, 168.9, 156.8, 154.8, 128.4, 128.3, 114.9, 78.4, 70.5, 67.1, 63.6, 58.1, 56.8, 30.3, 28.1, 26.6. **HRMS** (+ESI): *m/z* calculat per a C₂₁H₂₈N₃O₇S

$[M + H]^+$ 466.1648, trobat 466.1634, (-ESI): m/z calculat per a $C_{21}H_{26}N_3O_7S$ $[M - H]^-$ 464.1491, trobat 464.1485.

7.1.4.4.3. Síntesi de l'àcid amoxiciloic (28)

7.1.4.4.3.1. Procediment general

Es va dissoldre amoxicil·lina (21.1 mg, 0.058 mmols) en tampó carbonat 0.2 M pH 11, i la mescla es va agitar durant 4 dies, a $T = 37$ °C i sota atmosfera d'argó. La reacció es va seguir cada dia per HPLC en fase reversa, utilitzant gradients lineals dels dissolvents A: H_2O -0.1 % TFA i B: MeOH i un flux de 1 mL/min. La detecció es va realitzar per UV a 230 nm. També es va seguir per UPLC-MS, amb un flux de 0.3mL/min utilitzant gradients lineals de dissolvents A: MeOH i B: H_2O -0.1% àcid fòrmic. L'amoxicil·lina en forma oberta es va separar per HPLC preparatiu i es va liofilitzar.



28

Sòlid blanc. **RP-HPLC Analític** $t_R = 9.1$ min (gradient lineal de 10% de B durant 2 min, llavors de 10% a 20% de B en 5 min i finalment del 20% al 50% de B en 25 min; flux de 1 mL/min; detecció per UV a 479nm), **RP-HPLC Preparatiu** $t_R = 43.1$ min (gradient de 18% a 26% de B durant 52 min i llavors de 26% a 100% de B en 7 min; flux de 7 mL/min; detecció per UV a 230 nm), **RMN de 1H** (400 MHz, DMSO) δ 7.45 (2H, d, $J = 8.4$, $HOC(CHCH)_2$), 7.00 (2H, d, $J = 8.4$, $HOC(CHCH)_2$), 5.16 (1H, s, $COCHNH$), 5.09 (1H, d, $J = 4.8$, $SCHCHCOOH$), 4.31 (1H, d, $J = 4.8$, $SCHCHCOOH$), 3.12 (1H, s, $C(CH_3)_2CHCOOH$), 1.21 (3H, s, CH_3), 1.15 (3H, s, CH_3), **RMN de 1H** (400 MHz, Na_2CO_3 in D_2O 10mM) δ 7.32 (2H, d, $HOC(CHCH)_2$), 6.83 (2H, d, $HOC(CHCH)_2$), 5.01 (1H, s, $COCHNH$), 4.94 (1H, d, $SCHCHCOOH$), 4.15 (1H, d, $SCHCHCOOH$), 2.97 (1H, s, $C(CH_3)_2CHCOOH$), 1.06 (3H, s, CH_3), 1.00 (3H, s, CH_3), **RMN de ^{13}C** (100 MHz, DMSO) δ 175.5, 175.1, 168.7, 157.0, 129.8, 123.9, 116.3, 75.2, 65.5, 59.5, 58.4, 56.2, 25.9, 25.5, **RMN de ^{13}C** (400 MHz, D_2O) δ 177.6, 176.7, 170.4, 158.6, 131.5, 125.6, 118.0, 76.9, 67.2, 61.1, 60.1, 57.9,

27.6, 27.2, **HRMS** (+ESI): m/z calculat per a $C_{16}H_{22}N_3O_6S$ $[M + H]^+$ 384.1229, trobat 384.1228, (-ESI): m/z calculat per a $C_{16}H_{20}N_3O_6S$ $[M - H]^-$ 382.1073, trobat 382.1108.

7.2. Part immunoquímica

7.2.1. Materials i instrumentació

El pH i la conductivitat de tots els tampons i solucions emprades van ser mesurats en un pHmetre 540 GLP i un conductímetre LF 340, respectivament (WTW, Weilheim, Alemanya). Les plaques de 96 pous de poliestirè emprades en el desenvolupament dels immunoassaigs van ser comprades a Nunc (Maxisorb, Roskilde, DK). Les etapes de rentat de les plaques es van dur a terme en un rentador de microplaques de 96 pous Tecan (Tecan Trading Ag, Switzerland) o un rentador Biotek ELx465 (Biotek Inc.). Les lectures d'absorbància es van dur a terme en un lector de microplaques SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a una longitud d'ona fixa de 450 nm. Les corbes d'inhibició obtingudes en els assaigs competitius van ser analitzades amb una equació logística de quatre paràmetres, emprant el software SoftmaxPro v2.6 (Molecular Devices) i GraphPad Prism 3.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). L'aigua MilliQ es va obtenir del sistema Barnstead NANOpure Diamond.

El sistema de purificació de proteïnes emprat va ser l'ÄKTAprime™ plus (Amersham now GE Healthcare) usant columnes per a l'eliminació de sals HiTrap TM (5 mL de fase) empaquetades amb Sephadex G-25 Superfine (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). L'scanner utilitzat va ser un Microarray Scanner Scan Array Gx Plus Perkin Elmer precisely i el spotter fou un BioOdyssey™ Calligrapher™ MiniArrayer BioRAD. El fluorímetre utilitzat va ser Spectra max Gemini XPS, Molecular Devices.

7.2.1.1. Reactius químics i immunoquímics

Les proteïnes emprades en la preparació dels conjugats com l'HCH (Horseshoe Crab Hemocyanin), la BSA (Bovine Serum Albumin), i l'HRP (Horseradish Peroxidase) i la Poli-lisina van ser adquirides a Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), l'aminodextrà de pes molecular 70000 Da (AD) va ser adquirit a Invitrogen, Molecular Probes™. Altres reactius immunoquímics com els adjuvants de Freund complets i incomplets, la estreptavidina unida a HRP (STAV-HRP), les immunoglobulines de cabra específiques pel reconeixement d'anticossos de conill acoblades a HRP (anti-IgG-HRP), la immunoglobulina anti IgG de ratolí produïda en cabra (IgG

anti-ratolí) i la immunoglobulina de conill IgG també van ser adquirides a Sigma Chemical Co. (St.Luis, MO, USA). Altres anticossos com l'anti-amoxicil·lina monoclonal produït en ratolí (anti-amx) va ser subministrat per GeneTex, les immunoglobulines monoclonals contra IgEs humanes (IgG anti IgEs humanes) van ser subministrades per Abcam, l'anticòs contra IgEs humanes conjugat a rodamina (anti IgE humanes-TRITC) va ser d'Antibodies On-line i l'anti-IgGs humanes conjugat a Alexa Fluor 647 va ser subministrat per Invitrogen, Molecular Probes. El reactiu de Bradford per a la detecció de proteïnes va ser adquirit a BioRad Laboratories GMBH (Munich, Alemanya).

La xilazina i la ketamina van ser subministrades per Imalgene 1000 de Merial Laboratoris, S.A., Barcelona, Espanya.

Les partícules magnètiques van ser Dynabeads MyOne™ Tosylactivated de Invitrogen (Dynal AS, Oslo, Norway) i el GPTS (3-glicidoxipropil trimetoxisilà) va ser de Sigma-Aldrich(St. Louis, MO).

La dicitclohexilcarbodiimida (DCC) i la N-hidroxisuccinimida (NHS) emprades en els processos de conjugació van ser adquirides a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La resina di(n-butil)-fenilfosfina polistirè va ser adquirida a Novabiochem (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 2013).

Les mostres de sèrum dels pacients al·lèrgics van ser gentilment subministrades pel servei d'al·lèrgologia de l'Hospital de Bellvitge i les de sèrum blanc van ser obtingudes de donacions del banc de sang de Hospital de Vall d'Hebrón.

7.2.1.2. Tampons

El PBS és tampó fosfat 10 mM amb un 0.8% de NaCl a pH 7.5. El PBST és PBS amb un 0.05% de Tween 20. El tampó borat és una solució d'àcid bòric-borat de sodi 0.2 M a pH 8.7. El tampó de tapissat és carbonat/bicarbonat 0.05 M a pH 9.6. El tampó citrat és una solució 0.04 M de citrat sòdic a pH 5.5. La solució substrat conté un 0.01% de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) i un 0.004% de H₂O₂ en tampó citrat.

El tampó Tris pH 7.1-9.5 és una solució de tris(hidroximetil)aminometà 0.1 M. El pH s'ajusta amb HCl.

El "printing" buffer utilitzat per immobilitzar biomolècules sobre la superfície del microarray és una solució de fosfat 150 mM amb 0.01% de dodecilsulfat de sodi (SDS).

El tampó de SSC-betaïna és un 50% d'una solució 1 M de citrat sòdic i 0.1 M de NaCl, un 30% d'una solució de betaïna 5 M, un 10% d'una solució de SDS 1% i un 9% d'H₂O.

7.2.2. Preparació dels immunoreactius

7.2.2.1. Síntesi dels immunògens

7.2.2.1.1. Síntesi de l'immunogen Amx1-PLL

a. Protocol de conjugació: Ester actiu

L'Amoxicil·lina protegida amb el grup Teoc (10 μ mol, 5.09 mg) es va dissoldre en DMF anhidre (140 μ L) i es va afegir consecutivament DCC (50 μ mol, 10.31 mg) en 30 μ L DMF anhidre i NHS (25 μ mol, 2.88 mg) en 30 μ L DMF anhidre. La solució es va mantenir en agitació durant 1 hora, fins a observar l'aparició d'un precipitat blanc corresponent a la diciclohexilurea, que es va eliminar a continuació per centrifugació a 10000 rpm durant 10 minuts. El sobrenedant es va afegir gota a gota sobre una solució de PLL en PBS 10 mM pH 7.5 (1.8 mL). La reacció d'acoblament es va agitar suaument durant 3 hores a temperatura ambient. El conjugat es va purificar per diàlisi contra PBS (0.5 mM 4x5 L) i H₂O MilliQ (1x5 L) per tal d'eliminar les sals i finalment es va liofilitzar. En aquesta etapa es va obtenir un 91% de rendiment (9.1 mg de conjugat).

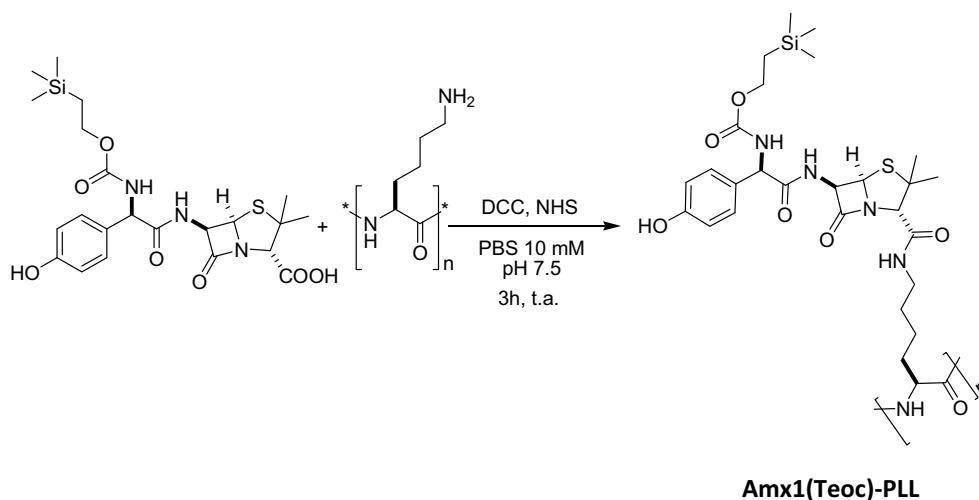


Figura 7.3. Formació de l'ester actiu de l'àcid de l'amoxicil·lina protegida.

b. Protocol de desprotecció

Optimització de la reacció

Es va addicionar fluorur de tetrabutilamoni (TBAF) (600 μ mols, 8,4 mg) sobre l'Amx-Teoc (30 μ mols, 1,6 mg) en DMF anhidre (520 μ L). La solució resultant es va agitar durant 30 minuts a temperatura ambient. La reacció va agafar una coloració rosa clar. La reacció es va seguir per HPLC analític a un flux de 1 mL/ml, utilitzant gradients lineals dels dissolvents A: H₂O-0.1 % TFA i B: MeOH (de 0% a 6% de B durant 9 min, gradient de 6% a 65% en 3 min i de 65% a 100% en 8 min). El t_R del Teoc-Amx = 16,2 min i el t_R de l'amoxicil·lina = 13,1 min. La conversió va ser del 100%.

També es van fer proves utilitzant diferents proporcions d'H₂O en el medi de reacció. En cap d'elles es va observar evolució de la reacció.

Protocol general

Es va addicionar fluorur de tetrabutilamoni (TBAF) (100 μ mols, 26.14 mg) sobre la solució del conjugat PLys-Amx-Teoc en DMF anhidre (2 mL). La solució resultant es va agitar durant 30 minuts a temperatura ambient. La reacció va esdevenir de color rosa clar. El conjugat es va purificar per diàlisi contra PBS (0.5 mM 4x5 L) i H₂O MilliQ (1x5 L) per tal d'eliminar les sals i la DMF i finalment es va liofilitzar. Es va obtenir un rendiment final del 88% (8.8 mg de conjugat).

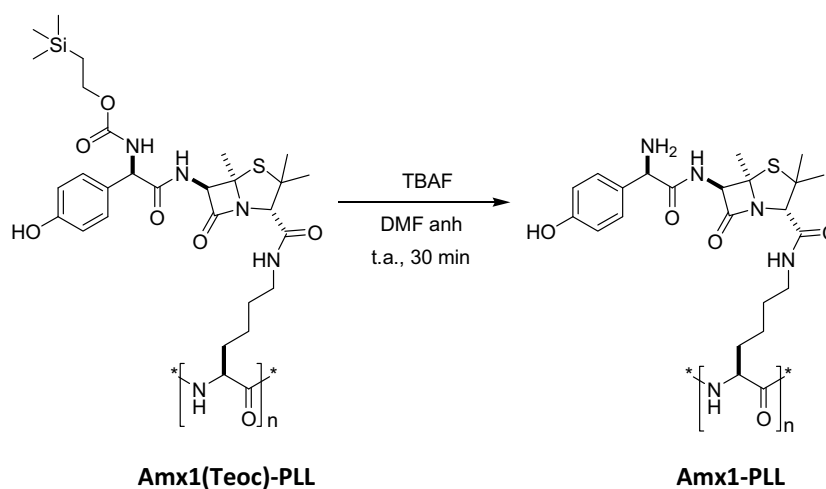


Figura 7.4. Etapa de desprotecció del grup protector Teoc.

7.2.2.1.2. Síntesi de l'immunogen Amx2-Br/Mp-HCH

a. Reducció del dímer per alliberar el grup tiol

Optimització de la reacció de reducció

Diversos equivalents de la resina DBPP es van addicionar a una solució de dímer (10 μ mol) en DMF anhidre (160 μ L). La mescla de reacció es va agitar a diferents temperatures, durant 2 hores sota atmosfera d'argó. Es va afegir H₂O MilliQ (40 μ L) a diferents temps i es va continuar agitant. La suspensió es va filtrar amb una xeringa amb filtre (0.45- μ m de mida de porus). La resina es va rentar amb H₂O (2 \times 120 μ L). La mescla resultant es va analitzar per HPLC analític a un flux de 1 mL/ml, utilitzant gradients lineals dels dissolvents A: H₂O-0.1 % TFA i B: MeOH (isocràtic a 40% de B durant 5 min, gradient de 40% a 80% en 20 min). T_R dímer = 14.9 min, t_R = 4.7 min. La detecció es va realitzar per UV a 230 nm. A la **Taula 7.18**, s'observen els resultats obtinguts:

Taula 7.18. Resultats obtinguts a les proves d'optimització de la reacció de reducció.				
Reacció	Quantitat de resina (mg)	Temps reacció (min)	Temperatura de reacció (°C)	Rendiment (%)
1	25	60	25	35
2	50	60	25	44
3	100	60	25	49
4	100	10	25	33
5	100	30	25	38
6	100	60	40	83
7	100	60	50	90
8	100	5	40	62
9	100	30	40	64

Tot i que l'entrada 7 de la Taula presenta un rendiment de reacció més elevat, es va escollir treballar en les condicions descrites en l'entrada 6 per evitar productes de degradació causats per la temperatura.

Procediment general

La resina DBPP (100 mg, 50 μmol , 5 equiv.) es va addicionar a una solució de dímer (10 μmol) en DMF anhidre (160 μL). La mescla de reacció es va agitar a 40 $^{\circ}\text{C}$, durant 1 hora sota atmosfera d'argó. Es va afegir aigua MilliQ (40 μL) a la suspensió, que es va agitar durant 1 hora més. La suspensió es va filtrar amb una xeringa amb filtre (0.45- μm de mida de porus). La resina es va rentar amb H_2O (2 \times 120 μL). Finalment, la combinació de les fraccions es van utilitzar immediatament per a la conjugació (pas 3).

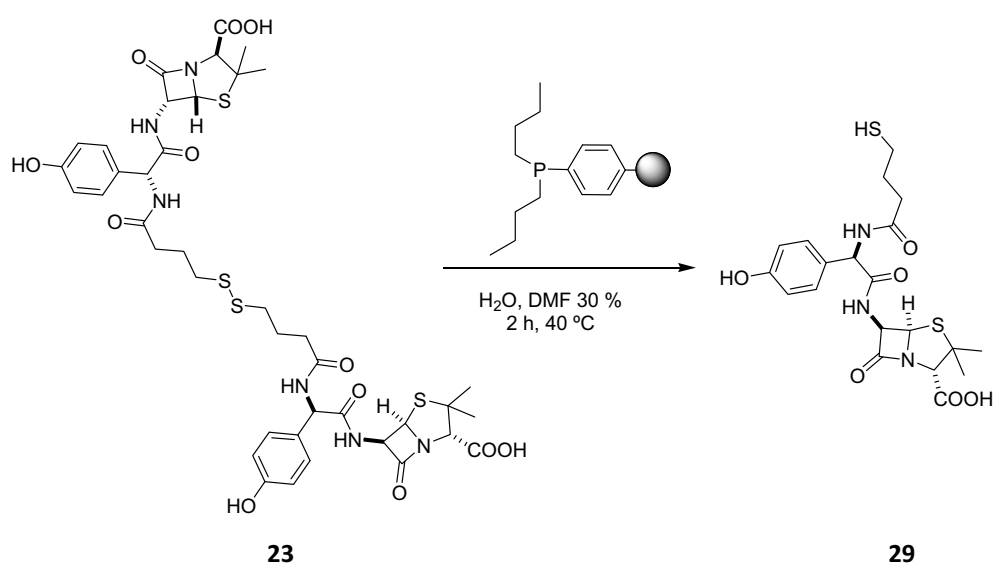


Figura 7.5. Reducció del dímer per alliberar el grup tiol.

b. Activació de la proteïna

Simultàniament al pas 1, els braços espaciadors N-SBrA o N-SMP (20 μmol) en DMF anhidre (100 μL) es van addicionar gota a gota sobre una solució de proteïna HCH (20 mg) en PBS (1.5 mL). La mescla de reacció es va agitar a temperatura ambient durant 2 hores i es va purificar passant la solució per una columna de dessalat Sephadex G-25 eluint amb buffer PBS. Les fraccions que contenen conjugat (Br/Mp-proteïna) es van recollir i finalment combinar. Aquesta fracció de proteïna activada es va utilitzar per a la posterior conjugació amb l'haptè.

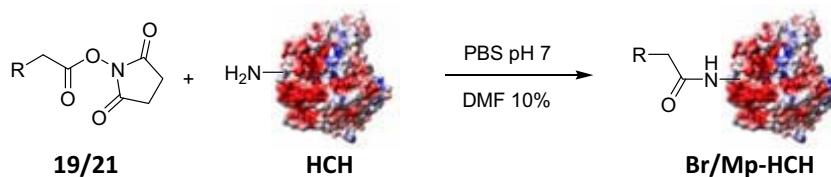


Figura 7.6. Activació de la proteïna. On R = grup Maleimido o Br.

c. Conjugació de l'haptè a la proteïna

La solució de reducció del dímer (20 μ mol) obtinguda en el pas 1 es va addicionar a les proteïnes derivatitzades (20 mg) preparades al pas 2. La mescla de reacció es va agitar a temperatura ambient durant 2 h per a obtenir el corresponent haptè-Br/Mp-proteïna, es va purificar passant la solució per una columna de dessalat Sephadex G-25 eluint amb H_2O . Finalment es va liofilitzar, obtenint un rendiment del 10% (1,93 mg de conjugat).

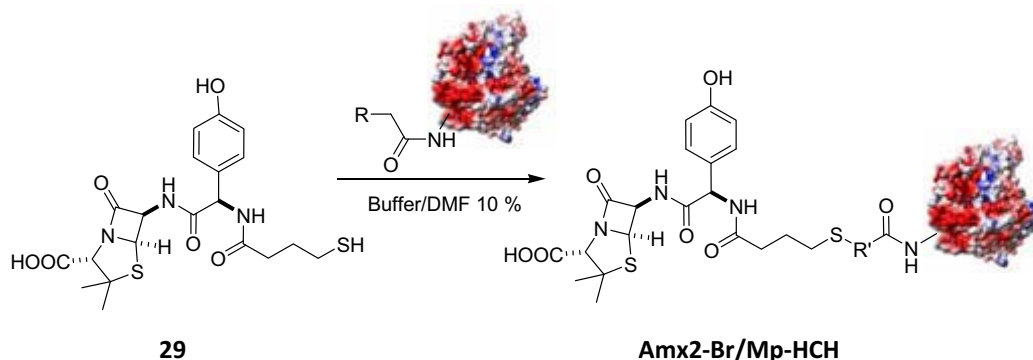


Figura 7.7. Conjugació de l'haptè (Monòmer) a la proteïna prèviament activada. On R = grup maleimido o Br, R' = CH_2 o $CH_2CH_2C_4H_2NO_2$.

7.2.2.2. Síntesis i caracterització dels competidors

Els competidors/antígens es poden classificar en 3 grups en funció del mètode de conjugació amb el que han estat sintetitzats. Tots els conjugats amb BSA van poder ser caracteritzats per MADI-TOF-MS tal i com s'indica a l'apartat següent.

7.2.2.2.1. Caracterització dels conjugats. Determinació de la densitat d'haptè

La densitat d'haptè del conjugat de BSA a penicil·lines es va calcular mitjançant MALDI-TOF-MS determinant el pes molecular de les proteïnes natives sense conjugat i comparant-lo amb el del conjugat. Els espectres es van obtenir barrejant una solució de la matriu, l'àcid *trans*-3,5-dimetoxi-4-dihidro-cinnàmic (10 mg/mL, 2 µL en una solució de CH₃CN/H₂O 1:1, 0.1 % HCOOH) amb una solució del conjugat o de la proteïna (5 mg/mL, 2 µL en CH₃CN/H₂O 1:1, 0.1% HCOOH). La densitat d'haptè (δ haptè) es va calcular d'acord amb la següent equació:

$$\delta_{\text{haptè}} = (\text{PM}(\text{Conjugat}) - \text{PM}(\text{Proteïna})) / \text{PM}(\text{haptè})$$

7.2.2.2.2. Grup 1. Conjugació a la proteïna a través del grup –COOH de l'anell tiazolidínic.

En el cas de competidors provinents de l'amoxicil·lina i la ampil·lina va haver-hi un pas previ de protecció del grup –NH₂ amb el grup Teoc (apartat 7.1.4.4.1).

Cadascuna de les penicil·lines (10 µmols) es van dissoldre en DMF anhidre (140 µL) i es van addicionar consecutivament DCC (50 µmols, 10.31 mg) en DMF anh (30 µL) i NHS (25 µmols, 2.88 mg) en DMF anh (30 µL). La solució es va mantenir en agitació durant 1 hora, fins a observar l'aparició d'un precipitat blanc corresponent a la diciclohexilurea, que a continuació es va eliminar per centrifugació a 10000 rpm durant 10 minuts. El sobrenedant es va addicionar gota a gota sobre una solució d'aminodextrà/BSA en PBS 10 mM pH 7.5 (1.8 mL). La reacció d'acoblament es va agitar suaument durant 3 hores a temperatura ambient. El conjugat es va purificar per diàlisi contra PBS (0.5 mM 4×5 L) i H₂O MilliQ (1×5 L) per tal d'eliminar les sals i finalment es va liofilitzà.

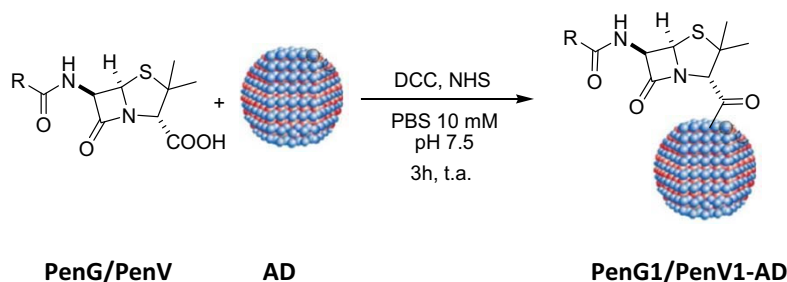


Figura 7.8. Conjugació de les penicil·lines a la proteïna a través del grup –COOH lliure.

Protocol de desprotecció

Es va addicionar fluorur de tetrabutilamoni (TBAF) (100 μmols, 26.14 mg) sobre la solució del conjugat AD-Amx-Teoc/AD-Amp-Teoc en DMF anhidre (2 mL). La solució es va agitar durant 30 minuts a temperatura ambient. La reacció es va tornar de color rosa clar. El conjugat es va purificar per diàlisi contra PBS (0.5 mM 4×5 L) i H₂O MilliQ (1×5 L) per tal d'eliminar les sals i finalment es va liofilitzar. A la **Taula 7.19.** s'observen els resultats obtinguts.

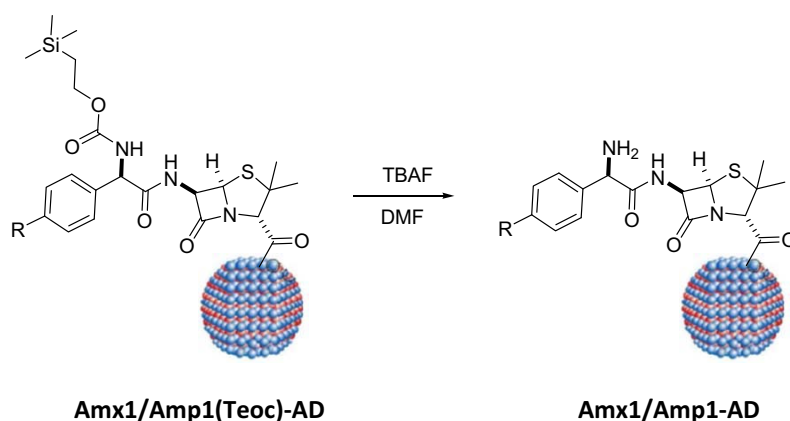
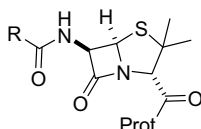


Figura 7.9. Etapa de desprotecció del grup protector Teoc.



Taula 7.19. Resum dels competidors obtinguts en el grup 1.						
Conjugació	R	Proteïna	Nom conjugat	Rendiment ₁ (%)	d.h. ^a	Rendiment ₂ (%)
1	NH ₂ CHC ₆ H ₄ OH	AD	Amx1-AD	79	-	76
2	NH ₂ CHC ₆ H ₅	AD	Amp1-AD	65	-	63
3	CH ₂ C ₆ H ₆	AD	PenG1-AD	75	-	-
4	CH ₂ OC ₆ H ₅	AD	PenV1-AD	69	-	-
5	NH ₂ CHC ₆ H ₄ OH	BSA	Amx1-AD	77	7	73

^aLa d.h. només es va poder calcular per als conjugats amb BSA i abans de fer la desprotecció. Rendiment₁ correspon al rendiment abans de la desprotecció. Rendiment₂ correspon al rendiment final del bioconjugat.

7.2.2.2.3. Grup 2. Conjugació a la proteïna a través de la derivatització de les aminopenicil·lines del grup amino a un grup tiol

a. Reducció del dímer per alliberar el grup tiol

La resina DBPP (25 mg, 12.5 μmol , 1.25 equiv.) es va addicionar a una solució de dímer (10 μmol) en DMF anhidre (160 μL). La mescla de reacció es va agitar a 40 $^{\circ}\text{C}$, durant 2 hores sota atmosfera d'argó. Es va afegir aigua MilliQ (40 μL) a la suspensió, que es va agitar durant 1 hora més fins que es va observar una reducció completa del dímer. La suspensió es va filtrar amb una xeringa amb filtre (0.45 μm de mida de porus). La resina es va rentar amb H_2O (2×120 μL). Finalment, la combinació de les fraccions es van utilitzar immediatament per a la conjugació (pas 3).

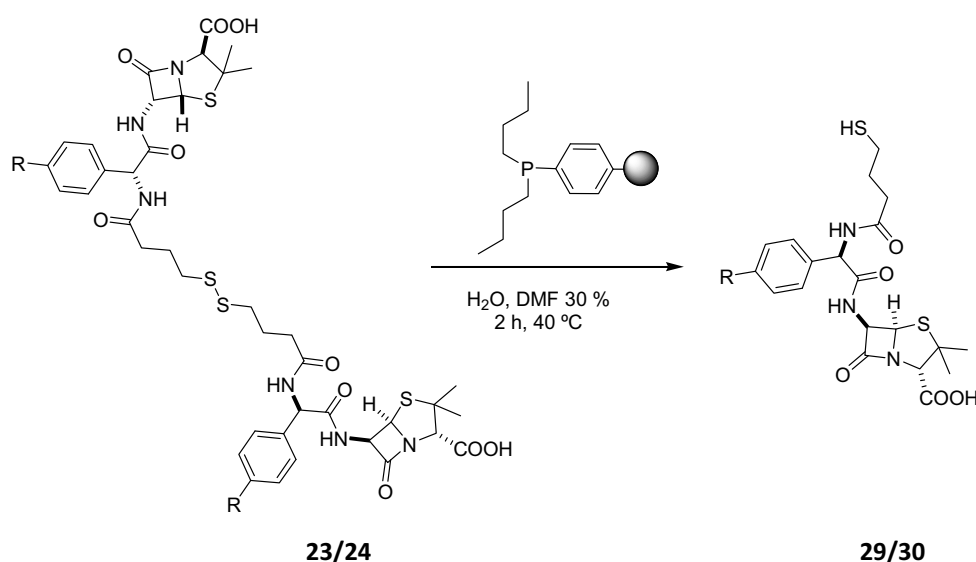


Figura 7.10. Reducció del dímer per alliberar el grup tiol. On R = -OH o -H.

b. Activació de la proteïna

Simultàniament al pas 1, el braç espaiador N-SBrA/N-SMP/N-SIA (20 μmol) en DMF anhidre (100 μL) es va addicionar gota a gota sobre una solució de proteïna AD/BSA (20 mg) en PBS (1.5 mL). La mescla de reacció es va agitar a temperatura ambient durant 2 hores i es va purificar passant la solució per una columna de dessalat Sephadex G-25 eluint amb buffer PBS.

Les fraccions que contenen el conjugat proteic es van recollir i finalment combinar. Aquesta fracció de proteïna activada es va utilitzar per a la posterior conjugació amb l'haptè.

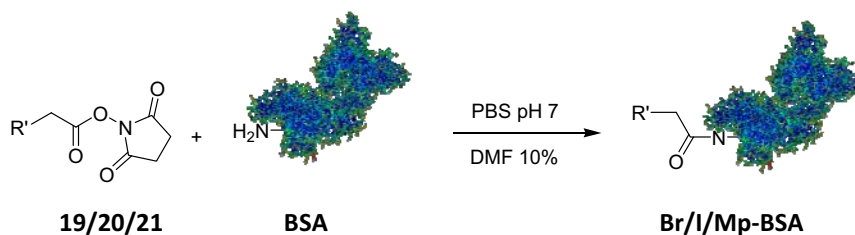
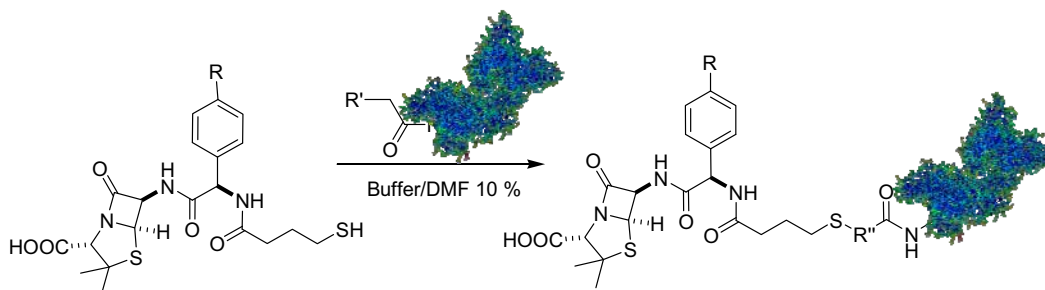


Figura 7.11. Activació de la proteïna.

c. Conjugació de l'haptè a la proteïna

La solució de reducció del dímer (20 μmol) obtinguda en el pas 1 es va addicionar a les proteïnes derivatitzades (20 mg) preparades al pas 2. La mescla de reacció es va agitar a temperatura ambient durant 2 h per a obtenir el corresponent conjugat i es va purificar passant la solució per una columna de dessalat Sephadex G-25 eluint amb H₂O i es va liofilitzar. A la **Taula 7.20.** es mostren els resultats obtinguts.



Taula 7.20. Resum dels competidors obtinguts en el grup 2.

Conjugació	R	R'	R''	Prot.	Nom conjugat	Rend ₁ (%) ^a	d.h. ₁ ^a	Rend ₂ (%) ^b	d.h. ₂ ^b
1	OH	I	CH ₂	BSA	Amx2-I-BSA	73	17	71	5
2	H	I	CH ₂	BSA	Amp2-I-BSA	51	17	44	5
3	OH	CH ₂ C ₄ O ₂ H ₂	CH ₂ CH ₂ C ₄ H ₂ NO ₂	BSA	Amx2-Mp-BSA	70	14	67	7
4	H	CH ₂ C ₄ O ₂ H ₂	CH ₂ CH ₂ C ₄ H ₂ NO ₂	BSA	Amp2-Mp-BSA	85	9	79	4
5	OH	CH ₂ C ₄ O ₂ H ₂	CH ₂ CH ₂ C ₄ H ₂ NO ₂	AD	Amx2-Mp-AD	64	-	54	-
6	H	CH ₂ C ₄ O ₂ H ₂	CH ₂ CH ₂ C ₄ H ₂ NO ₂	AD	Amp2-Mp-AD	67	-	62	-
7	OH	Br	CH ₂	BSA	Amx2-Br-BSA	83	11	79	5

^aRend₁ i d.h.₁ corresponen als resultats obtinguts per a l'activació de la proteïna.

^bRend₂ i d.h.₂ corresponen als resultats obtinguts per al conjugat final, després de la unió a la penicil·lina.

7.2.2.2.4. Grup 3. Conjugació a la proteïna a través del grup amino de les aminopenicil·lines

a. *Activació de la proteïna*

El braç espaciador N-SIA (20 μmol) en DMF anhidre (100 μL) es va addicionar gota a gota sobre una solució de proteïna BSA (20 mg) en PBS (1.5 mL). La mescla de reacció es va agitar a temperatura ambient durant 2 hores i es va purificar passant la solució per una columna de dessalat Sephadex G-25 eluint amb buffer PBS. Les fraccions que contenien conjugat (I-proteïna) es van recollir i finalment combinar. Aquesta fracció de proteïna activada es va utilitzar per a la posterior conjugació amb l'haptè. Es va obtenir una densitat d'haptè de 35 i un rendiment de 74% (14.8 mg).

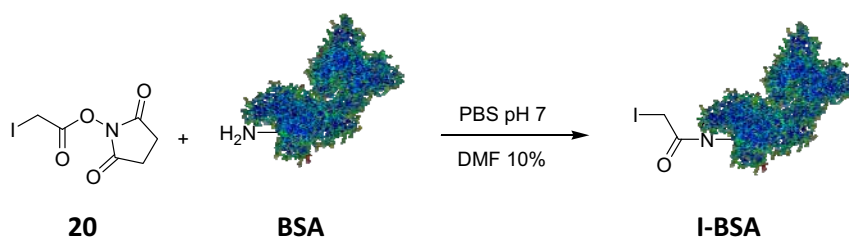


Figura 7.12. Activació de la proteïna.

b. *Conjugació de l'haptè a la proteïna*

L' amoxicil·lina (7.3 mg, 20 μmol) es va addicionar a les proteïnes derivatitzades (20 mg) preparades al pas anterior. La mescla de reacció es va agitar a temperatura ambient durant 2 h per a obtenir el corresponent conjugat i es va purificar passant la solució per una columna de dessalat Sephadex G-25 eluint amb H_2O . Finalment es va liofilitzar i es va obtenir una densitat d'haptè de 4 i un rendiment de 68 % (13.5 mg).

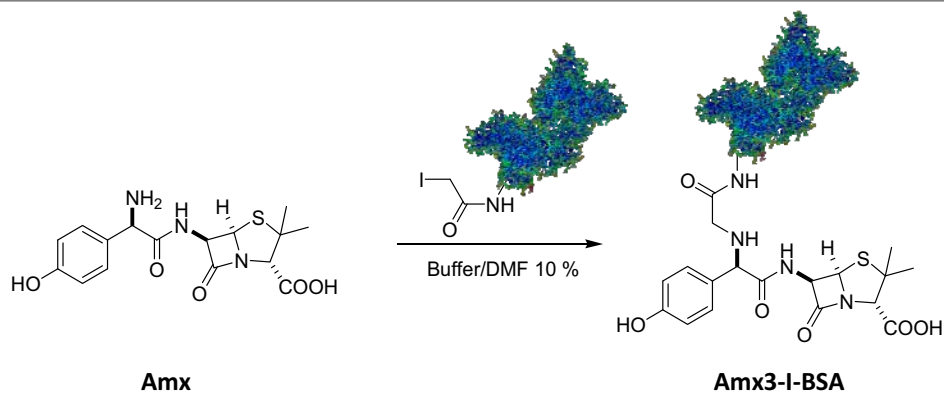
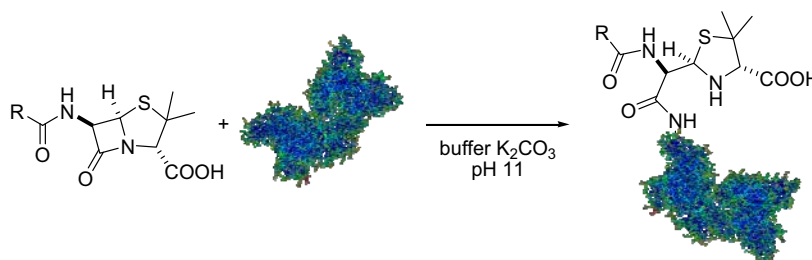


Figura 7.13. Conjugació de l'haptè (amoxicil·lina) a la proteïna activada.

7.2.2.2.5. Grup 4. Conjugació a la proteïna a través de l'obertura de l'anell β -lactàmic

Cadascuna de les penicil·lines (10 μ mol) es van dissoldre en 1 mL de buffer K_2CO_3 pH 11 i es van afegir lentament a una solució de BSA (10 mg) en buffer K_2CO_3 (1mL). La solució resultat es va agitar durant 2 dies a 37 $^{\circ}C$. Cadascuna de les conjugacions es va purificar per diàlisi contra PBS (0.5 mM 4 \times 5 L) i H_2O MilliQ (1 \times 5 L) per tal d'eliminar les sals, i finalment es va liofilitzar. Els resultats es mostren a la **Taula 7.21.**:



Taula 7.21. Resultats obtinguts la producció dels conjugats de grup 4.					
Conjugació	R	Prot.	Nom conjugat	Rendiment (%)	d.h.
1	$NH_2CHC_6H_4OH$	BSA	Amx4-BSA	27	2
2	$NH_2CHC_6H_5$	BSA	Amp4-BSA	30	3
3	$CH_2C_6H_6$	BSA	PenG-BSA	32	3
4	$CH_2OC_6H_5$	BSA	PenV-BSA	26	2

7.2.3. Obtenció dels anticossos policlonals específics

7.2.3.1. Protocol d'immunització

Es van fer servir per cadascun dels immunògens tres conills blancs femelles de la varietat New Zealand amb un pes al voltant de 1-2 Kg, pel immunogen Amx1-PLys (conills 214, 215, 216) i pel immunogen Amx2-Br-HCH (conills 217, 218, 219). Per a cadascun dels conills, es va utilitzar 100 µL de la solució de l'immunogen de concentració 1 mg/mL en PBS i es va portar a un volum de 0.5 mL amb PBS (100 µg d'immunogen per conill). Aquesta solució es va emulsionar amb el mateix volum d'adjuvant de Freund complet. L'emulsió (1 mL per conill) es va injectar intradèrmicament a diferents punts del llom de l'animal. Passat un mes de la primera injecció, s'estimulà de nou el sistema immune de l'animal inoculant-lo amb 100 µg més de l'immunogen emulsionat amb adjuvant de Freund incomplet. Les inoculacions es van repetir cada quatre setmanes aproximadament emprant l'adjuvant de Freund incomplet fins a un total de sis inoculacions, quan ja no es va observar més evolució en el títol d'anticòs.

7.2.3.2. Extracció de les sangs parcials. Avaluació del títol d'anticòs

Durant el procés d'immunització es van extreure petites quantitats de sang (4-5 mL) per tal d'avaluar la resposta immune. El sèrum preimmune es va extraure just abans d'iniciar el protocol, mentre que l'extracció dels diferents antisèrums parcials es va dur a terme entre 8-10 dies després de cada inoculació. Les extraccions es van realitzar a través de l'artèria central de l'orella del conill mitjançant una cànula connectada a un tub hermètic al buit, de tipus vacutainer, proveït amb un gel separador de sèrum. Els antisèrums recollits es van agitar, es van centrifugar durant 10 min a 10000 rpm i es van dividir en alíquotes de 1.8 mL que es van guardar a -40 °C després d'addicionar un 0.02% de NaN₃. Les alíquotes de treball es van guardar a 4 °C. L'evolució del títol d'anticossos es va avaluar mesurant la unió dels antisèrums parcials amb els antígens homòlegs, seguint un protocol basat en un assaig indirecte no competitiu monodimensional (apartat 7.2.4.1.2.).

7.2.3.3. Obtenció de les sangs finals

Passats deu dies de la darrera inoculació es va dur a terme l'exsanguinació final dels conills. Als animals se'ls va administrar xilazina com a relaxant muscular amb una solució de

concentració 10 mg/mL en solució salina isotònica de NaCl (0.5 mL/Kg). Els animals es van anestesiar emprant una solució formulada comercialment que contenia ketamina com a principi actiu (0.5 mL/Kg). Seguidament, per tal de canular l'artèria caròtida es va fer una incisió a la pell i el teixit subcutani de la zona traqueal emprant un bisturí. Amb unes pinces mosquit i unes tisores de punta arrodonida es va separar amb cura el teixit muscular fins a quedar l'artèria completament aïllada. A continuació, delimitant un segment d'uns 4 cm de longitud, es van passar dos fils al voltant de l'artèria. Amb el fil de la part distal es va fer un nus per tal d'evitar la dessagnació del conill en tallar el vas. Tot seguit es va realitzar un tall en direcció obliqua en la zona superior del vas i es va introduir la cànula. Es va realitzar un nus amb l'altre fil per tal de fixar la cànula i es va connectar amb el tub vacutainer per tal de procedir a recollir la sang, que es va tractar tal i com es descriu en l'apartat anterior. L'antisèrum recollit es va guardar a -40 °C. Les alíquotes de treball es van conservar a 4 °C.

7.2.4. Assaigs immunoenzimàtics no competitius

7.2.4.1. Assaig no competitiu en format indirecte

7.2.4.1.1. Protocol general

Les microplaques es van tapissar amb el corresponent antigen de tapissat a la dilució adient (100 µL/pou en tampó de tapissat carbonat-bicarbonat) i es van incubar a 4 °C durant tota la nit. Al dia següent les plaques es van rentar exhaustivament amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i es va addicionar l'antisèrum diluït apropiadament en PBST (100 µL/pou). Després d'incubar 30 minuts a temperatura ambient, la placa es va rentar de nou (300 µL/pou, 4 vegades) i es va addicionar una solució de Anti-IgG-HRP (1/6000 en PBST, 100 µL/pou) que es va deixar incubant 30 min més a temperatura ambient. La placa es va rentar de nou (300 µL/pou, 4 vegades), es va afegir la solució de substrat (100 µL/pou) i es va incubar 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

7.2.4.1.2. Assaig monodimensional (1D) no competitiu

L'evolució del títol de l'anticòs durant els processos d'immunització, així com l'estudi de l'afinitat dels anticossos obtinguts pels diferents antigens de tapissat preparats, es va avaluar

mitjançant assaigs immunoenzimàtics no competitiu en format indirecte. En el cas dels controls durant el procés d'immunització les plaques es van tapissar amb el conjugat homòleg a la immunització corresponent (1 µg/mL, 100 µL/pou) i es van incubar a 4 °C durant tota la nit. Al dia següent es van rentar amb PBST, es van afegir dilucions seriades dels antisèrums parcials obtinguts així com l'antisèrum preimmune (dilucions de 1/1000 a 1/64000 en PBST i zero d'As (només PBST), 100 µL/pou) i es van incubar durant 30 min a temperatura ambient. Les plaques es van rentar i es van processar tal i com es descriu al protocol general (vegeu apartat 7.2.4.1.1.)

De manera similar per la valoració dels antisèrums finals, les plaques es van tapissar amb els diferents antígens corresponents a una concentració fixa de 1 µg/mL en tampó carbonat-bicarbonat (100 µL, pou, 1 AT per columna) i es va avaluar l'afinitat dels antisèrums corresponents (dilucions de 1/1000 a 1/64000 en PBST i zero d'As (només PBST), 100 µL/pou). Les plaques es van processar tal i com es descriu al protocol general. Aquelles combinacions As/AT que van donar una resposta major a 0.5 UA en les condicions de reactius més concentrades després d'incubar durant 30 minuts van ser seleccionades per a dur a terme els assaigs no competitiu bidimensionals (assaigs 2D, apartat 7.2.4.1.3.).

7.2.4.1.3. Assaig bidimensional (2D) no competitiu

Amb aquelles combinacions As/AT seleccionades en l'assaig 1D es van realitzar els assaigs 2D. Es va utilitzar una placa per cada combinació. La placa es va tapissar amb 12 dilucions diferents de l'antigen en sentit horitzontal (de 1 µg/mL a 0.9 ng/mL en tampó carbonat-bicarbonat i només tampó, corresponent a zero d'AT, 100 µL/pou) i després d'incubar una nit a 4 °C es va rentar i es va afegir una sèrie de dilucions seriades del corresponent As en sentit vertical (8 dilucions, de 1/500 a 1/32000 en PBST), i zero d'As (només PBST), 100 µL/pou). Es va incubar durant 30 min a temperatura ambient, es va rentar i es va processar tal i com es descriu al protocol general. Es van recollir com a concentracions òptimes d'As i d'AT, aquelles que produïren valors al voltant de 0.7-1 unitats d'absorbància i que estaven al voltant del 80-90% de saturació de reactius.

7.2.4.2. Assaig no competitiu en format directe

7.2.4.2.1. Protocol general

Les plaques es van tapissar amb l'As diluït apropiadament en tampó de tapissat (100 µL/pou) i es va guardar a 4 °C durant tota la nit. Al dia següent es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i es va addicionar el traçador enzimàtic (TE) diluït adientment en PBST (100 µL/pou). Després d'incubar 30 min a temperatura ambient es va rentar la placa de nou, a continuació es va afegir la solució de substrat (100 µL/pou) i es va incubar 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

7.2.4.2.2. Assaig monodimensional (1D) no competitiu

La valoració de l'avidessa dels antisèrums finals pels traçadors enzimàtics es van dur a terme mitjançant els assaigs 1D no competitiu en format directe. Les microplaques es van tapissar amb els antisèrums finals diluïts en el tampó de tapissat (dilució 1/1000) i es van guardar a 4 °C tota la nit. Al dia següent es van rentar les plaques, es van afegir 7 dilucions dels TE corresponents (2 µg/mL a 0.031 µg/mL en PBST i només tampó, 100 µL/pou) i es van incubar durant 30 min a temperatura ambient. Les plaques es van rentar i es van processar tal i com es descriu al protocol general.

Aquelles combinacions As/AT que van donar valors d'absorbància superiors a 0.5 van ser seleccionades per a dur a terme els posteriors assaigs 2D (apartat següent).

7.2.4.2.3. Assaig bidimensional (2D) no competitiu

Per a cada combinació As/TE es va emprar una placa. Cada placa es va tapissar amb 12 dilucions diferents de l'As en sentit horitzontal (de 1/1000 a 1/124000 en tampó de tapissat i només tampó, corresponent a zero d'As, 100 µL/pou) i després d'incubar una nit a 4 °C es va rentar i es van afegir dilucions seriades del TE en sentit vertical (de 2 µg/mL a 0.031 µg/mL en PBST, i zero de TE(només PBST), 100 µL/pou). Es va incubar durant 30 min a temperatura ambient, es va rentar i es va continuar procedint tal i com es descriu al protocol general. Es va recollir com a concentracions òptimes d'As i de TE aquelles que van produir valors d'unitats d'absorbància al voltant de 0.7-1 i que estaven al voltant del 80-90% de saturació de reactius.

7.2.5. Assaigs immunoenzimàtics competitiu

7.2.5.1. Protocol general per a un ELISA en format directe

Les plaques es van tapissar amb l'As apropiadament diluït en tampó de tapissat (100 µL/pou) durant tota la nit a 4 °C. Al dia següent es van rentar i es van afegir les solucions d'analit (partint d'una solució 10 µM a 0.2 pM en PBST, i zero d'analit (només PBST), 50 µL/pou). Després de 30 min de competència a temperatura ambient, les plaques es van rentar i es va afegir la solució de substrat (100 µL/pou). La reacció enzimàtica es va deixar evolucionar durant 30 min i es va aturar amb H₂SO₄ 4 N (50 µL/pou). Els valors d'absorbància obtinguts es van mesurar a una longitud d'ona de 450 nm.

La corba de calibratge obtinguda es va ajustar a una equació logística de quatre paràmetres representada per la següent expressió:

$$Y = B + \frac{A - B}{1 + \left(\frac{C}{X}\right)^D}$$

On A és l'absorbància màxima (Abs_{màx}), B és l'absorbància mínima (Abs_{mín}), C és la concentració al 50 % de la Abs_{màx} menys Abs_{mín} (IC₅₀) i D és el pendent en el punt d'inflexió de la corba sigmoide.

7.2.5.2. Protocol general per a un ELISA en format indirecte

Les plaques es van tapissar amb l'AT a la concentració corresponent (100 µL/pou en tampó de tapissat) durant tota la nit a 4 °C. Al dia següent, es van rentar i es van afegir les solucions d'analit (partint d'una solució 10 µM a 0.2 µM en PBST, i zero d'analit (només PBST), 50 µL/pou) seguides per la solució de l'As apropiadament diluït (50 µL/pou) i es va deixar incubant 30 minuts més a temperatura ambient. La placa es va rentar de nou, seguidament es va afegir la solució de substrat (100 µL/pou) i es va incubar 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4 N (50 µL/pou) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

La corba de calibratge obtinguda es va ajustar a l'equació logística de quatre paràmetres definida a l'apartat anterior.

7.2.5.3. Factors estudiats per a la optimització d'un assaig competitiu

7.2.5.3.1. Influència de la concentració de Tween 20 en l'assaig

Es van preparar solucions de PBST amb diferents percentatges de Tween 20 (0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005%, 0.001% i 0%) amb les quals es van preparar corbes de calibratge d'analit així com les corresponents dilucions d'As.

7.2.5.3.2. Influència del temps de preincubació

En una placa tapissada, s'hi van afegir 5 corbes de calibratge preparades en PBST, que prèviament havien estat preincubades amb l'anticòs (format directe) o amb TE (format indirecte), adientment diluït, durant diferents temps : 60 min, 45 min, 30 min, 15 min i 0 min (sense preincubar). Un cop addicionada la mescla (100 µL/pou), aquesta es va deixar competint durant 30 min. A partir d'aquest moment la placa es va processar tal i com es descriu al protocol general.

7.2.5.3.3. Influència del temps de competència

En una placa tapissada, es van afegir l'analit i l'anticòs a diferents intervals de temps, de manera que es van establir diferents temps de competència tals com 15 min, 30 min, 45 min, 60 min i 90 min. La placa es va processar tal i com es descriu al protocol general.

7.2.5.3.4. Influència del pH

Es van preparar solucions de PBST amb valors de pH ajustats a 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5 i 10.5, que posteriorment es van emprar per preparar les corbes d'analit i les solucions d'anticòs. Per a realitzar l'experiment, es van tapissar 3 plaques i a cada una d'elles es van afegir les 9 corbes diferents (3 rèpliques de cada corba, una per placa). Les plaques es van processar tal i com es descriu al protocol general.

7.2.5.3.5. Influència dels dissolvents orgànics

L'efecte del dissolvent orgànic es va estudiar afegint la proporció de dissolvent en PBS i posterior addició de la corresponent quantitat de Tween 20 per a totes les etapes de l'assaig. Els dissolvents estudiats van ser: metanol, etanol, acetonitril, 2-propanol, dimetilsulfòxid, dimetilformamida i dioxà. Es van preparar al 2%, 5%, 10%, 20% de dissolvent orgànic i es va comparar amb la corba de referència sense dissolvent. Les plaques es van processar tal i com s'explica en els protocols generals.

7.2.6. Obtenció dels anticossos monoclonals

7.2.6.1. Protocol d'immunització

L'immunogen utilitzat per a la immunització dels 3 ratolins blancs Balb/c (1,2,3,) es descriu a l'apartat 7.2.2.1.2. L'Amx2-Mp-HCH (50 µg) es va dissoldre en PBS estèril (100 µL) i es va emulsionar amb adjuvant de Freund complet (100 µL). La mescla resultat es va injectar a cadascun dels ratolins en la regió peritoneal. Per tal d'estimular el sistema immunològic de l'animal es van fer dos inoculacions més a la segona i quarta setmana utilitzant adjuvant de Freund incomplet i finalment es va realitzar una última injecció a la setena setmana dissolent l'immunogen únicament en PBS.

7.2.6.2. Extracció de les sangs parcials. Avaluació del títol de l'anticòs

Per tal de seguir el títol de l'anticòs es van extraure mostres de sang dels ratolins punxant en la vena mandibular, localitzada a la cara del ratolí. Aquestes mostres es van extreure abans de la primera immunització, dos setmanes abans de la inoculació final i el dia de la fusió. La sang es va recollir en petits tubs i es va deixar a temperatura ambient durant 30 minuts. Després, es va centrifugar durant 5 min a 12000 rpm i es van transferir a altres tubs de 0.5 mL. El sèrum es va guardar a -20 °C. L'evolució del títol d'anticossos es va avaluar mesurant la unió dels antisèrums parcials a microplaques tapissades amb els antígens homòlegs, seguint un protocol basat en un assaig indirecte no competitiu monodimensional (apartat 7.2.4.1.2.).

A continuació es descriu la composició de cadascun dels medis cel·lulars que es van fer servir durant el procés de producció d'anticossos monoclonals.

Medi incomplet (IM): Està compost per DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (500 mL), Gentamicina (250 µL), L-alanina, L-glicina (5 mL) i NEAA (solució d'aminoàcids no essencials) (5 mL).

Medi complet (NP3): Està compost per IM (90 mL) i BFS (Sèrums fetal boví) (10 mL).

Medi complet (NP3 – 15% BFS): Està compost per IM (85 mL) i BFS (15 mL).

Medi HAT: Utilitzat pel al creixement de les cèl·lules, es compon de IM (77 mL), BFS (20 mL), HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) (2 mL) i HFCS (fusió d'hibridoma i suplement de clonació) (1 mL).

7.2.6.3. Descongelació de les cèl·lules de mieloma

Aquestes cèl·lules es guarden en criovials submergits en nitrogen líquid. Per tal de descongelar-les adequadament es van extraure del bany de nitrogen líquid i ràpidament es van col·locar en un bany d'aigua a 37 °C. Les cèl·lules es van resuspendre agitant amb una pipeta i seguidament es van afegir a un recipient estèril amb medi incomplet. Per tal de repartir bé les cèl·lules per tot el medi, es va agitar el recipient d'adalt cap avall. Tot seguit es va centrifugar durant 5 minuts a 300G i es va eliminar el sobrenedant. Es va afegir medi complet (12 mL) preescalfat a 37 °C i es va agitar per resuspendre les cèl·lules. El medi es va repartir en dos plaques de cultiu. Es van guardar a l'incubador a 37 °C amb un 5% CO₂.

7.2.6.4. Obtenció de la melsa

El ratolí es va submergir en una bossa de plàstic plena de CO₂ durant uns minuts fins que es va deixar de moure. Per tal de desinfectar l'animal es va submergir en una solució d'etanol al 70% i es va immobilitzar exposant l'àrea abdominal.

La sang final es va obtenir mitjançant una punció al cor amb una xeringa de 2 mL. La sang es va extraure lentament per tal d'evitar el col·lapse del cos. La sang final es va recollir en un tub de 0.5 mL i es va tractar de la mateixa manera que a l'apartat 7.2.3.3.

El ratolí es va girar lleugerament exposant el costat de la melsa. La pell i els músculs van ser tallats amb unes tisores les quals es van submergir constantment en alcohol assecant-se amb una flama. Quan es va aconseguir obtenir la melsa es va deixar sobre una placa p100 i

es va submergir en medi complet per tal de netejar-la. Es va tornar a transferir a una segona placa amb nou medi complet.

Utilitzant la part final d'una xeringa estèril, la melsa es va triturar fins que no es van observar grumolls. La mescla obtinguda es va filtrar, i aquest es va transferir a un recipient amb 50 mL de medi NP3.

El recipient es va centrifugar durant 5 min a 300g a 20 °C. El sobrenedant es va eliminar, el pelet obtingut es va agitar i es va afegir buffer de lisis d'eritròcits (1 mL) durant 1 min. Seguidament, es va afegir medi NP3 (50 mL) fred a la solució i es va tornar a centrifugar durant 5 min a 300g a 20 °C. Novament es va eliminar el sobrenedant i el pelet es va resuspendre en medi NP3 (50 mL) a 37 °C. La solució resultant es va filtrar, es va centrifugar durant 5 minuts a 300g a 20 °C i el pelet resultant es va diluir en medi IM (50 mL). Les cèl·lules es van contar i es van tornar a centrifugar durant 5 min a 300g a 20 °C.

Només les melses provinents dels ratolins 1 i 3 van ser escollides per a continuar amb el procés, ja que els anticossos policlonals produïts per aquests ratolins van donar una major resposta en el títol que el antiserum del ratolí 2.

7.2.6.5. Cèl·lules de mieloma

Les cèl·lules de mieloma es van centrifugar durant 5 min a 300 g a 20 °C, el sobrenedant es va descartar, el pelet es va agitar i es va afegir medi IM (25 mL). Les cèl·lules es van dividir en dos recipients i es va afegir més medi IM (fins a 50 mL). Els recipients es van centrifugar durant 5 min a 300g a 20 °C. El pelet obtingut es va mesclar amb nou medi IM (50 mL).

7.2.6.6. Fusió

El pelet obtingut de les cèl·lules de la melsa es va mesclar amb les cèl·lules de mieloma a una proporció de 1:4. El volum es va ajustar a 50 mL en medi IM. Es va mesclar bé i es va traslladar a un nou recipient. La solució es va centrifugar durant 5 min a 300g a 20 °C i el sobrenedant es va eliminar.

Addició del polietilenglicol (PEG):

- a) Es va addicionar el PEG (1 mL) gota a gota a través de la paret del recipient mentre la mescla s'agitava. Un cop finalitzada l'addició es va deixar 1 min agitant.
- b) Es va afegir medi NP3 (1 mL) durant 1 min amb agitació.

- c) Es va afegir medi NP3 (2 mL) durant 1 min.
- d) Es va addicionar medi NP3 (9 mL) durant 3 min.
- e) Es va afegir suaument medi NP3 fins arribar a 50 mL sense agitació. El recipient es va deixar reposar durant 30-45 min a temperatura ambient.

La solució es va centrifugar durant 5 min a 300 g a 20 °C. Es va afegir al pelet NP3 amb 15% BFS, quantitat que s'havia d'ajustar al número de cèl·lules contades per pou, en aquest entre 150.000-200.000 cèl·lules/pou. El sobrenedant resultant es va repartir en plaques de 96 pous (100 µL/pou) i es van incubar tota la nit a 37 °C amb un 5% CO₂. Després de 12 hores es va afegir medi HAT (100 µL) a cada pou.

7.2.6.7. Primer cribatge

El creixement dels clons provinents de les cèl·lules fusionades es va observar per microscopi i en un mapa de microplaca es va dibuixar la seva posició i mida. Els clons es van representar com a cercles grisos i les cèl·lules aïllades com a puntets. Els mapes es poden veure a l'annex 3.

Es van tapissar 18 plaques amb l'antigen Amp2-I-BSA a una concentració de 0.5 µg/mL (100 µL/pou) i es van deixar tota la nit a 4 °C. Al dia següent es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades).

En les columnes senars de cada placa es va afegir PBS (50 µL/pou), i en les parells una solució d'amoxicil·lina de 200 nM en PBS (50 µL/pou). En condicions estèrils, es va agafar el sobrenedant (80 µL/pou) de cadascun dels pous provinents de la fusió i es va repartir en dos pous de la placa d'assaig, un amb analit i l'altre sense. Els pous de la placa de cultiu que contenien clons de cèl·lules fusionades probablement eren productores d'anticossos específics i per tant en el seu sobrenedant podia haver una certa concentració d'aquests anticossos. Per tal d'observar una certa competència, les plaques de l'assaig es van deixar 1 hora amb agitació. Les 18 plaques es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i es va afegir una solució d'IgG anti-ratolí-HRP en PBST diluït 1/6000 (100µL/pou). Les plaques es van deixar incubant durant 1 hora amb agitació. Novament les plaques es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades). Finalment es va afegir una solució de substrat (100 µL/pou) i les plaques es van incubar durant 30 min a temperatura ambient protegides de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

7.2.6.8. La clonació a partir de les cèl·lules del ratolí 3

Les cèl·lules que van produir anticossos que van demostrar inhibició van ser escollides per una posterior clonació. Només es van clonar cèl·lules provinents del ratolí 3. Els pous escollits van ser observats per microscopi i només els que es van observar clons (agrupacions cel·lulars) van ser escollits per continuar amb el procés.

De vegades tot i observar inhibició en l'screening podia passar que no hi haguessin clons en els pous corresponent, això succeïa perquè en alguns casos els clons productors acabaven morint i tan sols quedaven alguns anticossos en el sobrenedant.

Els 5 pous escollits van ser redissolts en medi (10 mL). La solució resultant es va dividir en parts iguals en una placa de 96 pous, per tal de dividir els clons al màxim i aconseguir aïllar cèl·lules productores d'anticossos específics en pous independents. D'aquesta manera, aquestes cèl·lules van poder proliferar de manera aïllada i generar clons productors d'un únic anticòs específic.

7.2.6.9. Segon cribatge de les cèl·lules fusionades del ratolí 1

Es va realitzar un segon cribatge de les cèl·lules fusionades del ratolí 1. En aquest cas 10 plaques van ser tapissades amb l'antigen Amx1-AD a una concentració 1 µg/mL (100 µL/pou), i es van deixar tota la nit a 4 °C. Al dia següent es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades).

En les columnes senars de cada placa es va afegir PBS (50 µL/pou) i en les parells una solució d'amoxicil·lina de 1 µM en PBS (50 µL/pou), una concentració considerablement més elevada que en el primer cribatge per tal d'observar una major diferència en l'assaig d'inhibició. En condicions estèrils, es va agafar el sobrenedant (80 µL/pou) de cadascun dels pous provinents de la fusió i es va repartir en dos pous de la placa d'assaig, un amb analit i un altre sense. Les plaques de l'assaig es van deixar 1 hora amb agitació. Les 10 plaques es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i es va afegir una solució d' IgG anti-ratolí-HRP en PBST diluït 1/600 (100µL/pou). Les plaques es van deixar incubant durant 1 hora amb agitació. Novament les plaques es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i finalment es va afegir una solució de substrat (100 µL/pou). Es va incubar 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

7.2.6.10. Cribatge dels clons provinents del ratolí 3

Els 5 clons escollits anteriorment per a la clonació van ser avaluats pel mateix mètode explicat anteriorment (apartat 7.2.6.7.).

6 plaques van ser tapissades amb l'antigen Amp2-I-BSA a una concentració de 1 µg/mL (100 µL/pou) i es van deixar tota la nit a 4 °C. Al dia següent es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades).

En les columnes senars de cada placa es va afegir PBS (50 µL/pou) i en les parells una solució d'amoxicil·lina de 1 µM en PBS (50 µL/pou). En condicions estèrils, es va agafar el sobrenedant (40 µL/pou) de cadascun dels pous provinents de la fusió i es va repartir en dos pous de la placa d'assaig, un amb analit i l'altre sense. Es va reduir el volum afegit de sobrenedant ja que hi havia molt poc medi en els pous de la placa de cultiu. Les plaques de l'assaig es van deixar 1 hora amb agitació. Les 5 plaques es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i es va afegir una solució d'anti-mouse-HRP en PBST diluït 1/6000 (100µL/pou). Les plaques es van deixar incubant durant 1 hora amb agitació. Novament les plaques es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i finalment es va afegir una solució de substrat (100 µL/pou). Les plaques es van incubar 30 min a temperatura ambient protegides de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es va mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

7.2.7. Assaigs de detecció d'immunoglobulines E específiques contra amoxicil·lina

7.2.7.1. Assaigs immunoenzimàtics en superfície

7.2.7.1.1. Optimització de la concentració d'estreptavidina

Cada placa es va tapissar amb 12 dilucions diferents d'estreptavidina en sentit horitzontal (de 1 µg/mL a 0.49 ng/mL en tampó de tapissat i només tampó, corresponent a zero d'estreptavidina, 100 µL/pou). Després d'incubar una nit a 4 °C, la placa es va rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i es van afegir dilucions seriades de biotina-HRP en sentit vertical (de 1 µg/mL a 7.8 ng/mL en PBST, i zero de biotina-HRP (només PBST), 100 µL/pou). Es va incubar durant 30 min a temperatura ambient, es va rentar, es va afegir la solució de substrat (100 µL/pou) i es va incubar durant 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es van mesurar els valors d'absorbància

obtinguts a 450 nm. Es va recollir com a concentració òptima d'estreptavidina aquella que estava al voltant del 80-90% de saturació del reactiu.

7.2.7.1.2. Assaigs immunoenzimàtics en format indirecte. Procediment general.

Les microplaques es van tapissar amb estreptavidina (0.5 µg/mL, 100 µL/pou en tampó de tapissat carbonat-bicarbonat) i es van incubar a 4 °C durant tota la nit. Al dia següent les plaques es van rentar exhaustivament amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i es van addicionar els corresponents adductes (NKAx1, NKAx2, NKAx3) i pèptid **6** a les concentracions pertinents (100 µL/pou en PBST). Després d'incubar durant 30 minuts a temperatura ambient, la placa es va rentar de nou (300 µL/pou, 4 vegades) i es va addicionar una solució d'una IgG anti-amoxicil·lina (1/500 en PBST, 100 µL/pou), que es va deixar incubant 30 min més a temperatura ambient. La placa es va rentar de nou (300 µL/pou, 4 vegades) i es va addicionar una solució de anti-IgG-HRP (1/6000 en PBST, 100 µL/pou), que es va deixar incubant 30 min més a temperatura ambient. La placa es va rentar de nou (300 µL/pou, 4 vegades), es va afegir la solució de substrat (100 µL/pou) i es va incubar 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

7.2.7.1.3. Assaig immunoenzimàtic en format directe

7.2.7.1.3.1. Validació dels adductes. Procediment general

Les plaques es van tapissar amb l'IgG Anti-amoxicil·lina diluïda apropiadament en tampó de tapissat (100 µL/pou) i es van guardar a 4 °C durant tota la nit. Al dia següent es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i es van addicionar els adductes diluïts adientment en PBST (100 µL/pou). Després d'incubar 30 min a temperatura ambient, es va rentar les plaques de nou, es va afegir una solució d'estreptavidina-HRP (0.1 µg/mL en PBST, 100 µL/pou) i es va incubar durant 30 min més. Tot seguit, es va afegir la solució de substrat (100 µL/pou) i es va incubar 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

7.2.7.1.3.2. Mostres de sèrums específics

a. Procediment general per a l'avaluació dels adductes

Les plaques es van tapissar amb una IgG anti-IgE humana diluïda apropiadament en tampó de tapissat (100 µL/pou), i es van guardar a 4 °C durant tota la nit. Al dia següent es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades), es va addicionar els sèrums dels pacients al·lèrgics (a una dilució màxima de 1/10, 100 µL/pou). Els sèrums es van incubar durant 1 hora a temperatura ambient i es van rentar. Es van addicionar els adductes diluïts adientment en PBST (100 µL/pou). Després d'incubar 30 min a temperatura ambient es va rentar la placa de nou, es va afegir una solució d'estreptavidina-HRP (0.1 µg/mL en PBST, 100 µL/pou) i es va incubar 30 min més. Tot seguit, es va afegir la solució de substrat (100 µL/pou) i es va incubar 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

b. Procediment general per a l'avaluació dels antígens

Les microplaques es van tapissar amb els antígens (1 µg/mL, 100 µL/pou en tampó de tapissat carbonat-bicarbonat) i es van incubar a 4 °C durant tota la nit. Al dia següent es van rentar amb PBST (300 µL/pou, 4 vegades) i es va addicionar els sèrums dels pacients al·lèrgics (a una dilució màxima de 1/10, 100 µL/pou). Les plaques es van incubar durant 1 hora a temperatura ambient i es van rentar. Es va addicionar una solució d'Anti-IgE unida a HRP (1/5000 en PBST, 100 µL/pou) i es va incubar 30 min més. Tot seguit, es va afegir la solució de substrat (100 µL/pou) i es va incubar 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (50 µL/pou) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

7.2.7.2. Assaigs immunoenzimàtic sobre partícula magnètica

7.2.7.2.1. Funcionalització de les partícules magnètiques

Es va agitar l'stock de partícules magnètiques en un vòrtex durant 5 min. Es va agafar una alíquota (400 µL, 40 mg) i es va afegir en un recipient de 2 mL. Es va addicionar una solució de tampó borat (400 µL) i es va agitar al vòrtex. Es va apropar el recipient a l'iman i després de

dos minuts es va eliminar el sobrenedant. Es van resuspendre novament les partícules magnètiques en tampó de borat (400 µL), es van agitar i es va eliminar el sobrenedant mitjançant la separació magnètica. Es va addicionar una solució de l'anticòs pertinent (2 mg/mL, 800 µL) i una solució 3M (NH₄)₂SO₄ (200 µL). Es va agitar durant 48 hores a temperatura ambient. Es va apropar el recipient a l'iman durant 2 min, es va recollir el sobrenedant i es va guardar. Aquest sobrenedant es va utilitzar per a quantificar el grau de conjugació de les partícules mitjançant el test de Bradford (es descriu a continuació). Les partícules conjugades a l'anticòs van ser tractades amb una solució 0.5 M d'etanolamina en tampó borat (800 µL) i una solució 3M (NH₄)₂SO₄ (200 µL). Es van deixar 24 hores agitant a temperatura ambient. Es va eliminar el sobrenedant mitjançant la separació magnètica i es van rentar 3 vegades amb PBST 0.1% PVP (800 µL). Les partícules magnètiques conjugades van ser guardades en PBST 0.1% PVP (1 mL) a 4 °C.

El grau de conjugació obtingut per al cas de la conjugació a IgG anti-IgG de ratolí va ser del 97%, en el cas de la conjugació de IgG anti-IgG de conill va ser del 100%, i en el cas de la conjugació a IgG anti IgE humana va ser del 87%.

Test de Bradford

Es van preparar rectes de calibratge (de 50 a 0.78 µg/mL) amb una solució d'anticòs IgG comercial amb tampó borat. Aquestes solucions estàndard, així com les mostres de sobrenedant recollides de les conjugacions amb les partícules magnètiques (en dilucions seriades), es van afegir a una microplaca (160 µL/pou) per triplicat, seguit immediateament del reactiu de Bradford (40 µL/pou). Després d'incubar 15 min a temperatura ambient es varen mesurar els valors d'absorbància a una longitud d'ona de 595 nm. Interpolant la recta de calibratge es va poder conèixer la quantitat d'anticòs del sobrenedant, es a dir la que no s'havia conjugat. Per tant, per diferència es va determinar la conjugació dels immunoreactius a les partícules.

7.2.7.2.2. Assaig immunoenzimàtic en format directe

7.2.7.2.2.1. Validació dels adductes. Procediment general

Per aquest assaig es van utilitzar les partícules magnètiques conjugades a IgG anti- IgG de ratolí i IgG anti-IgG de conill. Les partícules magnètiques conjugades es van afegir en

diferents recipients de 2 mL (25 µg/recipient), es van rentar 3 vegades amb PBST (400 µL/pou) i es va afegir l'IgG anti-amoxicil·lina (de ratolí adquirida comercialment o de conill produïdes durant aquest treball, As218) a diferents dilucions (1/20000, 1/5000, 1/2000, 1/1000, 1/500 en PBST i zero d'anticòs (només PBST), 200 µL/recipient). Es va deixar incubant durant 1 hora a temperatura ambient amb agitació. Es va rentar 3 vegades amb PBST (400 µL/recipient) separant el sobrenedant apropant la suspensió a l'iman durant 2 min. Es va afegir una solució dels adductes NKAx i el pèptid **6** (200 nM en PBST, 200 µL/recipient) i es va deixar incubant durant 1 hora a temperatura ambient amb agitació. Es va rentar 3 vegades amb PBST (400 µL/recipient) separant el sobrenedant apropant l'iman durant 2 min, es va afegir una solució d'estreptavidina-HRP (0.05 µg/mL en PBST, 200 µL/recipient) i es va incubar durant 30 min a temperatura ambient i amb agitació. Tot seguit, es va afegir la solució de substrat (200 µL/recipient) i es va incubar 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (100 µL/recipient) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

7.2.7.2.2.2. Mostres de sèrums específics. Procediment general

En aquest assaig es van utilitzar les partícules magnètiques conjugades a IgG anti- IgE humanes. Les MP conjugades es van afegir en diferents recipients de 2 mL (25 µg/recipient), es van rentar 3 vegades amb PBST (400 µL/pou) i es va afegir sèrum humà concentrat (100 µL/recipient). Es va deixar incubant durant 1 hora a 37 °C amb agitació. Es va rentar 3 vegades amb PBST (400 µL/recipient), separant el sobrenedant apropant l'iman durant 2 min, es va afegir una solució dels adductes NKAx i el pèptid **6** (200 nM en PBST, 200 µL/recipient). Finalment es va deixar incubant durant 1 hora a temperatura ambient amb agitació. Es va rentar 3 vegades amb PBST (400 µL/recipient), separant el sobrenedant apropant l'iman durant 2 min, es va afegir una solució d'estreptavidina-HRP (0.05 µg/mL en PBST, 200 µL/recipient) i es va incubar durant 30 min a temperatura ambient amb agitació. Tot seguit, es va rentar 3 vegades amb PBST (400 µL/recipient), separant el sobrenedant apropant l'iman durant 2 min, i es va canviar el recipient de cada assaig. Finalment es va afegir la solució de substrat (200 µL/recipient) i es va incubar 30 min a temperatura ambient protegida de la llum. La reacció es va aturar afegint H₂SO₄ 4N (100 µL/recipient) i es van mesurar els valors d'absorbància obtinguts a 450 nm.

7.2.7.2.2.3. Factors estudiats per a l'optimització de l'assaig

a. *Influència de la concentració de Tween 20 en l'assaig*

Es van preparar solucions de PBST amb diferents proporcions de Tween 20 (0.05 %, 0.1 %, 0 %) amb les quals es va realitzar l'etapa d'addició de l'adducte en l'assaig descrit a l'apartat 7.2.7.2.2.2.

b. *Influència de la presència de PEG i EtOH en l'etapa d'addició dels adductes*

Es van preparar solucions de PEG a diferents concentracions (0 %, 1 % i 5 %) i de EtOH (10 %), i es van utilitzar en l'etapa d'addició dels adductes a l'assaig descrit a l'apartat 7.2.7.2.2.2.

c. *Influència del temps a l'etapa d'incubació dels sèrums a l'assaig*

Es va realitzar l'assaig seguint el protocol descrit a l'apartat 7.2.7.2.2.2. però deixant l'etapa d'addició dels sèrums durant 1 h i 24 h amb agitació a temperatura ambient. Els resultats es van comparar amb els obtinguts amb un assaig realitzat amb el protocol estàndard.

d. *Influència de la temperatura a l'etapa d'incubació dels sèrums*

Es va realitzar l'assaig seguint el protocol descrit a l'apartat 7.2.7.2.2.2. però deixant 1 h a 37 °C i 25 °C en l'etapa de l'addició dels sèrums, i es van comparar els resultats obtinguts amb un assaig realitzat amb el protocol estàndard.

7.2.7.3. Immunoassaig per fluorescència sobre superfície de vidre

7.2.7.3.1. Funcionalització de les superfícies de vidre

El rentat de les superfícies de vidre es va realitzar amb les solucions descrites a continuació per tal de tenir el vidre preparat per a la seva funcionalització. Les superfícies de vidre van ser rentades amb H₂O i sabó, seguidament es van sonicar submergides en EtOH

durant 15 min i es van submergir en una mescla de $H_2SO_4:H_2O_2$ (relació 7:3) durant 1 hora. A continuació es van rentar amb H_2O . El següent pas va ser submergir-les en una solució de NaOH al 10% durant 1 h i després es van rentar amb H_2O i EtOH.

Un cop les superfícies van estar netes i activades, es va procedir a la seva funcionalització afegint GPTS (200 μ L/superfície de vidre) durant 1 hora. Seguidament es van rentar amb EtOH, es van sonicar submergides en EtOH durant 5 min i es van assecar amb N_2 .

7.2.7.3.2. Formació del complex estreptavidina-NKAx/pèptid 6

Per tal d'immobilitzar els adductes NKAx i el pèptid **6** sobre la superfície de vidre funcionalitzada amb grups epoxi, va ser necessària una etapa de preincubació amb estreptavidina.

En una microplaca de 96 pous es van afegir diferents concentracions d' estreptavidina (25 μ g/mL, 10 μ g/mL i 5 μ g/mL en printing buffer) i diferents equivalents d'adductes (NKAx) i pèptid (pèptid **6**), per a cadascuna de les concentracions d'estreptavidina anteriors (20, 10, 5 i 0 equivalents), tenint en compte que cada molècula d'estreptavidina pot unir-se a 4 d'adducte/pèptid. Es va deixar incubant durant 1h a 37 °C.

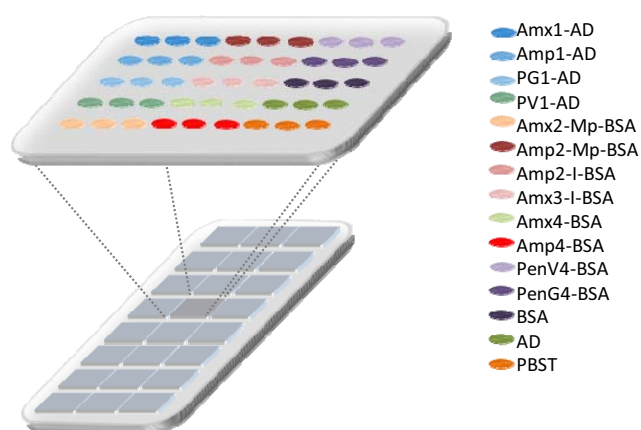
7.2.7.3.3. Immobilització dels bioconjugats sobre la superfície de vidre

Per tal d'immobilitzar tots els antígens i adductes sobre la superfície de vidre activada de manera puntual i ordenada va ser indispensable la utilització del dispensador de microgotetes (spotter).

Les condicions d'immobilització van ser de 25 °C amb una humitat del 60 % i el buffer de dilució utilitzat va ser el "printing buffer".

Es van immobilitzar els antígens següents: Amx1-AD, Amp1-AD, PG1-AD, PV1-AD, Amx2-Mp-BSA, Amp2-Mp-BSA, Amp2-I-BSA, Amx3-I-BSA, Amx4-BSA, Amp4-BSA, PenV4-BSA, PenG4-BSA i com a blancs BSA, AD i PBST.

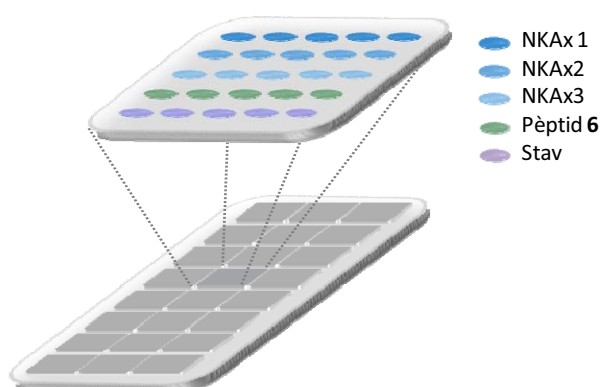
Per tal d'immobilitzar tots aquest bioconjugats a una concentració de 1 μ g/mL en printing buffer es van introduir els següents paràmetres al programa BioOdyssey Calligrapher.



Taula 7.22. Disseny de l'immunoassaig en superfície de vidre per avaluar els antígens.

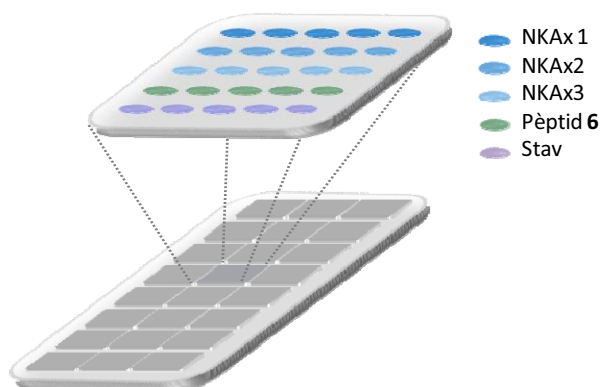
	X	Y
Quadrícula		
Núm. de punts per quadrícula	5	9
Núm. de rèpliques de punts per quadrícula	1	3
Superquadrícula		
Núm. de superquadrícules diferents	1	1
Núm. de rèpliques de superquadrícula	8	3
Núm. de mostres totals	15	

En el cas del complex estreptavidina-NKAx i estreptavidina-pèptid **6**, els paràmetres utilitzat en la optimització per immobilitzar totes les combinacions van ser els següents (**Taula 7.23.**):



Taula 7.23. Disseny de l'immunoassaig en superfície de vidre per avaluar les combinacions estreptavidina-adducte.		
	X	Y
Quadrícula		
Núm. de punts per quadrícula	4	5
Núm. de rèpliques de punts per quadrícula	1	5
Superquadrícula		
Núm. de superquadrícules diferents	4	3
Núm. de rèpliques de superquadrícula	8	3
Núm. de mostres totals	48	

Un cop escollides les millors combinacions optimitzades de estreptavidina-adducte amb les que es realitzarien els assaigs amb sèrums humans, el disseny final que es va utilitzar va ser el que es mostra a la **Taula 7.24.**:



Taula 7.24. Disseny de l'immunoassaig en superfície de vidre per avaluar els complexos estreptavidina-adducte.		
	X	Y
Quadrícula		
Núm. de punts per quadrícula	5	5
Núm. de rèpliques de punts per quadrícula	1	5
Superquadrícula		
Núm. de superquadrícules diferents	1	1
Núm. de rèpliques de superquadrícula	8	3
Núm. de mostres totals	5	

7.2.7.3.4. Immunoassaig fluorescent de validació dels antígens i dels complexos estreptavidina-NKAx/pèptid 6

Sobre les superfícies de vidre es van unir els bioconjugats tal i com es descriu a l'apartat 7.2.7.3.3.. Aquestes van ser rentades amb PBST (2×20 mL) submergint-les en càpsules de petri amb agitació durant 5 min. Tot seguit es van rentar amb H_2O per eliminar les sals i es van assecar.

A continuació, es va afegir l'As218 a diferents dilucions (1/1000, 1/10000, 1/100000 en PBST o sèrum blanc 1/5 i zero d'anticòs (només PBST o sèrum blanc diluït 1/5), 100 μ L/pou). Es van deixar incubant durant 30 min a temperatura ambient amb agitació. Les superfícies de vidre es van tornar a rentar de la mateixa manera que abans. Es va preparar una solució d'anti-IgG-TRITC (1/500 en PBST, 100 μ L/pou), la qual es va afegir a les superfícies de vidre. Es van incubar durant 30 min més a temperatura ambient. Es van rentar novament i la llum emesa per cada zona puntual de cada superfície de vidre va ser recollida després de ser excitada a 543 nm pel làser de l'scanner. Mitjançant aquest assaig es van obtenir les concentracions òptimes per a la preincubació dels adductes NKAx/pèptid 6 amb l'estreptavidina (25 μ g/mL d'estreptavidina amb 4 equivalents d'adducte NKAx/pèptid 6).

7.2.7.3.5. Procediment general per a l'immunoassaig fluorescent en mostres de sèrums específics

Les superfícies de vidre unides als bioconjugats van ser rentades amb PBST (2×20 mL), submergint-les en càpsules de petri amb agitació durant 5 min. Tot seguit es van rentar amb H_2O per eliminar les sals i es van assecar.

Es va afegir una etapa de bloqueig amb un 1% de llet en printing buffer filtrada per llana de vidre (100 μ L/pou). Cada superfície de vidre va ser rentada de la mateixa manera que abans i es va afegir els sèrums/plasmes dels pacients al·lèrgics i els sèrums/plasmes blancs a una dilució 1/5 (100 μ L/pou i PBST com a 0 d'anticòs). Es va deixar incubant durant 24 h a temperatura ambient amb agitació. La superfície de vidre es va rentar de la mateixa manera que abans. Es va preparar una solució d'anti-IgE Humana-TRITC (1/250 en PBST, 100 μ L/pou) i es va afegir a la superfície de vidre. Es va incubar durant 30 min més a temperatura ambient i, finalment es va mesurar la llum emesa a 543 nm mitjançant l'scanner.

7.2.7.3.6. Factors estudiats per a l'optimització de l'assaig

a. *Influència dels buffers de rentat*

Es van preparar solucions de PBS, PBST, PBS+Triton, PBS+SDS, Tris, TrisT, Tris+Triton, Tris+SDS amb 0.05% dels surfactants corresponents. Es va realitzar l'assaig com es descrit a l'apartat 7.2.7.3.5. però utilitzant aquests buffers en les etapes de rentat.

b. *Influència de la concentració de Tween 20 en l'assaig*

Es van preparar solucions de PBST amb diferents proporcions de Tween 20 (0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5%) amb les quals es va realitzar l'assaig descrit a l'apartat 7.2.7.3.5.

c. *Influència de la molaritat del PBST*

Es van preparar solucions de PBST a diferents molaritat (10 mM, 25 mM i 50 mM) i es van utilitzar a l'assaig descrit a l'apartat 7.2.7.3.5.

d. *Influència del buffer utilitzat en l'etapa d'immobilització*

Per tal d'immobilitzar els bioconjugats a les superfícies de vidre es van utilitzar 2 buffers diferents: SSC-betaïna i printing buffer. L'assaig es va desenvolupar tal i com es descriu a l'apartat 7.2.7.3.5.

e. *Influència de l'addició d'una etapa de bloqueig*

Es van preparar solucions de BSA, OVA, llet (al 1% i 3% en printing buffer) i etanolamina, PEGdiamina, PEGtiol-acid (100 mM i 500 mM) i es van afegir com a etapa de bloqueig (100 µL/pou), durant 30 min amb agitació, just després de l'etapa d'immobilització dels bioconjugats. Tot seguit es va rentar, tal i com s'especifica al protocol descrit a l'apartat 7.2.7.3.5., i es va continuar l'assaig.

f. Influència en l'assaig del tractament previ del sèrum

Els sèrums, prèviament a la seva utilització en l'assaig, van ser precipitats per tractament amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, amb PEG 6000 i amb àcid caprílic. També van ser filtrats per llana de vidre.

Per tal de dur a terme la precipitació amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el sèrum es va refredar (100 μL) a 4 °C i es va afegir el 50 % una solució de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturada (100 μL). Es va deixar d' 1-4 hores a 4 °C i es va centrifugar a 4 °C durant 30 min a 4000 G. El pelet es va reconstituir en 100 μL de PBST.

En el cas de la precipitació amb PEG 6000, es va preparar una solució al 20% w/v de PEG 6000 en PBS i es va afegir gota a gota a 4 °C sobre el sèrum (100 μL). Es va agitar durant 30 min. Es va centrifugar a 4 °C durant 30 min a 4000 G i el pelet es va reconstituir en 100 μL de PBS.

Finalment per a precipitar els anticossos mitjançant la precipitació amb àcid caprílic va ser necessària l'addició d'aquest (8.2 μL) sobre el sèrum (100 μL). Seguidament, es va agitar durant 30 min a temperatura ambient i es va centrifugar a 4 °C durant 30 min a 4000 G. El pelet es va reconstituir en 100 μL de PBS.

Aquests sèrums tractats van ser utilitzats seguint el protocol descrit a l'apartat 7.2.7.3.5. i els resultats es van comparar amb els resultats obtinguts amb sèrum sense tractar.

g. Influència del temps a l'etapa d'incubació dels sèrums a l'assaig

Es va realitzar l'assaig seguint el protocol descrit a l'apartat 7.2.7.3.5. però deixant 1 h i 24 h amb agitació a temperatura ambient l'etapa de l'addició dels sèrums i es van comparar els resultats obtinguts amb un assaig realitzat amb el protocol estàndard.

7.2.8. Assaigs de detecció d'immunoglobulines G específiques contra amoxicil·lina

7.2.8.1. Immunoassaig per fluorescència sobre superfície de vidre

7.2.8.1.1. Procediment general per a l'immunoassaig fluorescent en mostres de sèrums específics

La funcionalització de les superfícies de vidre, la formació del complex estreptavidina-NKAx/pèptid **6** i la immobilització dels bioconjugats sobre la superfície de vidre es va dur a terme seguint el protocol que es descriu als apartats 7.2.7.3.1., 7.2.7.3.2, 7.2.7.3.3., respectivament.

Les superfícies de vidre unides als bioconjugats van ser rentades amb PBST (2×20 mL) submergint-les en càpsules de petri amb agitació durant 5 min. Tot seguit es van rentar amb H₂O per eliminar les sals i es van assecar amb flux d'aire.

Es van afegir els sèrums/plasmes dels pacients al·lèrgics i els sèrums/plasmes blancs sense diluir (100 µL/pou i PBST com a 0 d'anticòs). Seguidament, es va deixar incubant durant 24 h a temperatura ambient amb agitació. La superfície de vidre es va rentar de la mateixa manera que abans. Es va preparar una solució d'anti-IgG Humana-Alexa647 (1/250 en PBST, 100 µL/pou) i es va afegir a la superfície de vidre. Es va incubar durant 30 min més a temperatura ambient. I es va recollir la llum emesa a 647 nm mitjançant l'scanner.

Annexes

Annex 1. Definició símptomes clínics

Agranulocitosi/agranulocitopènia: És una condició poc freqüent però potencialment greu, caracteritzada per una disminució del número de neutròfils per sota de 1 000- 1 500 cel/mm³.

Anafilàxia/anafilaxi: És una reacció immunològica generalitzada en tot l'organisme, un dels trastorns més greus i potencialment mortals. Es produeix en una gran varietat de situacions clíniques i és inevitable en la pràctica clínica. Amb més freqüència, és el resultat de reaccions immunològiques als aliments, medicaments i picadures d'insectes.

Anèmia aplàsica: És el desenvolupament incomplet o defectuós de les línies cel·lulars de la medul·la òssia. La disminució de producció de eritròcits produeix la anèmia.

Anèmia hemolítica: És un grup de trastorns hemolítics que causen la disminució de la massa de eritròcits en sang. A diferència de les anèmies no hemolítiques, en les anèmies hemolítiques la vida dels eritròcits en sang perifèrica està escurçada.

Angioedema: Es caracteritza per la ràpida tumefacció de la pell, les mucoses i els teixits submucosos. A part de la seva forma comú, induïda per al·lèrgies, s'ha enregistrat com a efecte secundari d'alguns medicaments.

Artràlgia: Significa literalment dolor de articulacions, és un símptoma de lesió, infecció, malaltia com les reumàtiques (particularment artritis i artrosi) o reacció al·lèrgica a fàrmacs.

Edema: És la acumulació de líquid en l'espai tissular intercel·lular o intersticial, a més de les cavitats de l'organisme.

Blastomicosi: Malaltia piogranulomatosa poc freqüent que afecta humans, gossos i gats, produïda pel fong dimòrfic conegut com *Blastomyces dermatitidis*, que es troba freqüentment al terra o a la fusta.

Eosinòfila: És la presència d'una quantitat anormalment elevada d'eosinòfils (leucòcits) en sang.

Eritema: Enrogiment de la pell condicionat per una inflamació deguda a un excés de reg sanguini mitjançant una vasodilatació. El eritema és un signe de diferents malalties infeccioses i de la pell.

Erupcions maculopapulars o murbiliformes: Són lesions dermatològiques que es caracteritzen morfològicament per l'aparició d'una pàpula sobre una taca.

Exantema: És una erupció cutània que apareix de forma aguda. Apareix freqüentment amb malalties generals infeccioses com xarampió, rubèola, varicel·la, escarlatina, dengue o tifus. Un exantema també pot ser conseqüència d'una incompatibilitat de fàrmacs.

Hepatitis colestàtica: Inflamació hepàtica provocada per una hepatitis infecciosa que produeix la detenció del flux de bilis en els conductes intrahepàtics.

Histoplasmosi: és una micosis sistèmica caracteritzada per lesions necrogranulomatoses, que afecta a carnívors, equins i humans per la infecció amb alguna de les tres subespècies del fong dimòrfic *Histoplasma capsulatum*.

Induració: Enduriment patològic dels teixits d'un òrgan.

Leishmaniosi: És una malaltia causada per un protozoo del gènere *Leishmania* que es transmet per la picadura d'un mosquit. Les manifestacions clíniques de la malaltia van des de úlceres cutànies que cicatritzen espontàniament, fins a formes fatals en que apareixen inflamacions greus del fetge i de la melsa.

Limfadenopatia: És un trastorn inespecífic dels ganglis limfàtics. Majoritàriament, el terme s'utilitza per denominar un augment de volum o inflamació dels ganglis limfàtics.

Lupus eritematós sistemàtic: És una malaltia autoimmune crònica que afecta al teixit conjuntiu, caracteritzada per la inflamació i danys de teixits mediat pel sistema immune, específicament degut a la unió d'anticossos a les cèl·lules de l'organisme i al dipòsit de complexos antígen-anticòs.

Pàpula: És un tipus de lesió en la pell, menor d'un centímetre, circumscrita, elevada, amb les vores ben definides, amb contingut sòlid. La majoria d'aquestes lesions es troben elevades sobre el nivell de la pell circumdant i no en els plans profunds, encara que poden comprendre tan dermatitis com epidermis.

Proteòlisi: És la degradació de proteïnes, ja sigui mitjançant enzims específics, proteases, o per medi de digestió intracel·lular.

Pruritus: És la irritació de la pell al final del recte (anus).

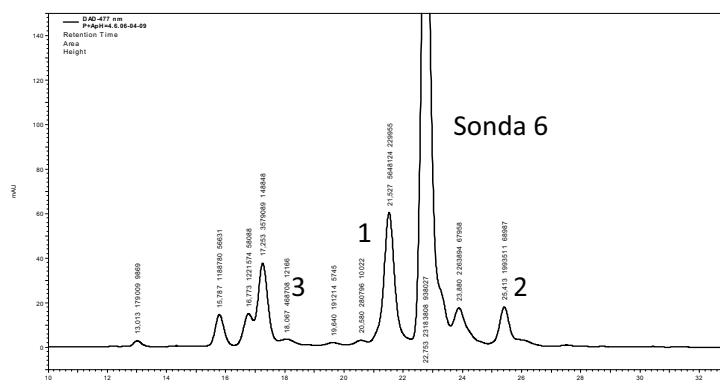
Toxoplasmosi: Malaltia infecciosa causada pel protozoo *Toxoplasma gondii*, un paràsit intracel·lular obligat. La toxoplasmosi pot causar infeccions lleus i asimptomàtiques, així com infeccions mortals que afecten majoritàriament al fetus, ocasionant la coneguda toxoplasmosi congènita. També pot ser greu quan afecta a nadons, gent gran i persones vulnerables per dèficit immunitari.

Trombocitopènia: És qualsevol situació de disminució de la quantitat de plaquetets circulants en el torrent sanguini per sota dels nivells normals, és a dir, inferior a $100\ 000/\text{mm}^3$.

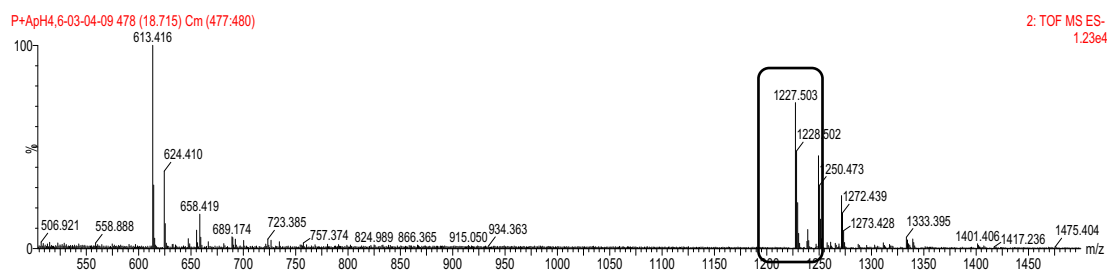
Urticària: És una malaltia de la pell que es caracteritza per lesions cutànies edematoses, de contorns delimitats i amb halo eritematós, generalment evanescent i canviant.

Annex 2. Caracterització per HPLC i Espectrometria de Masses dels adductes descrits en el capítol 2, sobre el disseny i síntesi de sondes peptídiques per a la utilització en diagnòstic clínic.

Obtenció dels adductes amoxicil·línics a pH 4.6 utilitzant el pèptid 6

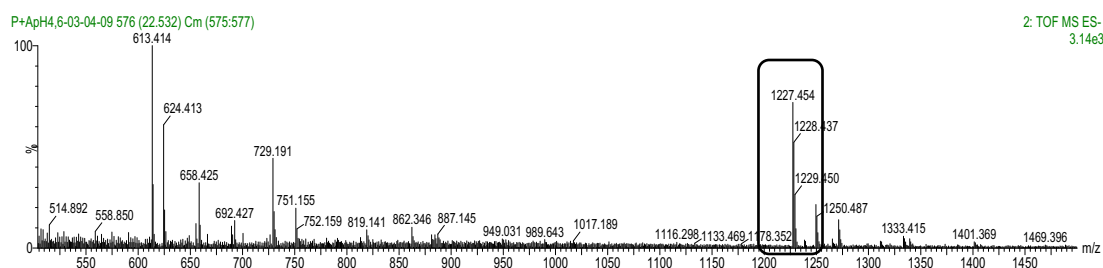


Pic 1: NKAx1



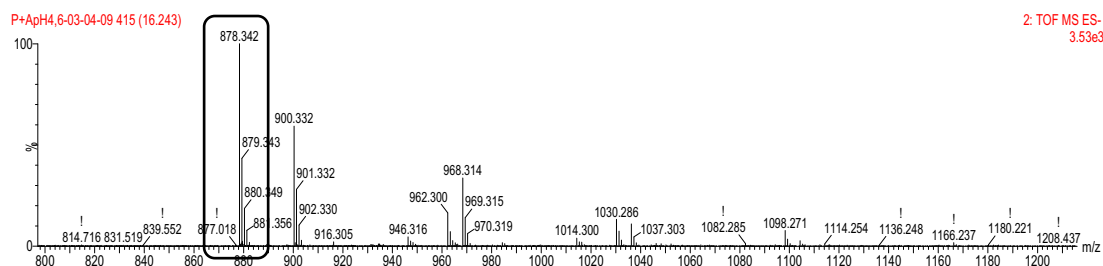
HRMS: (-ESI): m/z calculat per a $C_{52}H_{71}N_{14}O_{17}S_2 [M - H]^-$ 1227.4563, trobat 1227.4508.

Pic 2: NKAx2



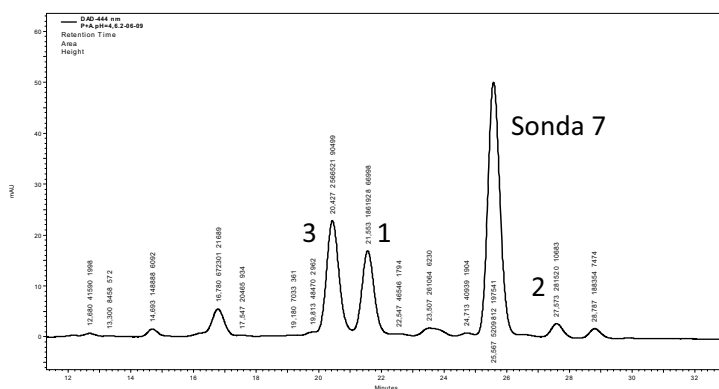
HRMS: (-ESI): m/z calculat per a $C_{52}H_{71}N_{14}O_{17}S_2 [M - H]^-$ 1227.4563, trobat 1227.4573.

Pic 3: Oxidació del pèptid 6

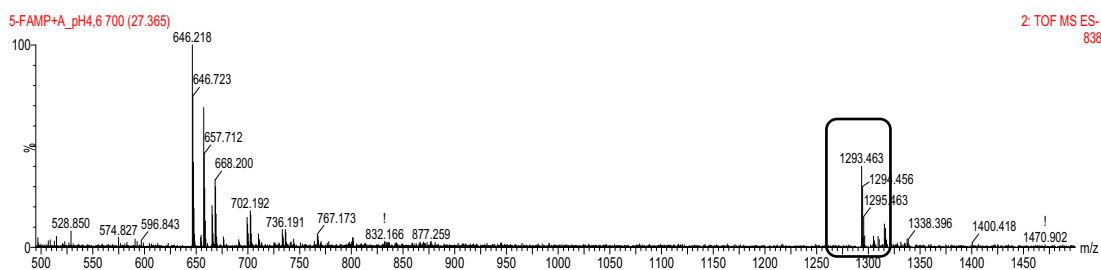


HRMS:(-ESI): m/z calculat per a $C_{36}H_{52}N_{11}O_{13}S [M - H]^-$ 878.3417, trobat 878.3467.

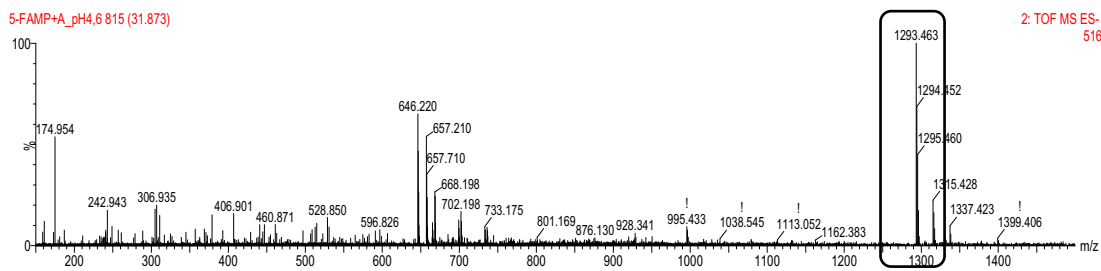
Obtenció dels adductes amoxicil·línics a pH 4.6 utilitzant el pèptid 7



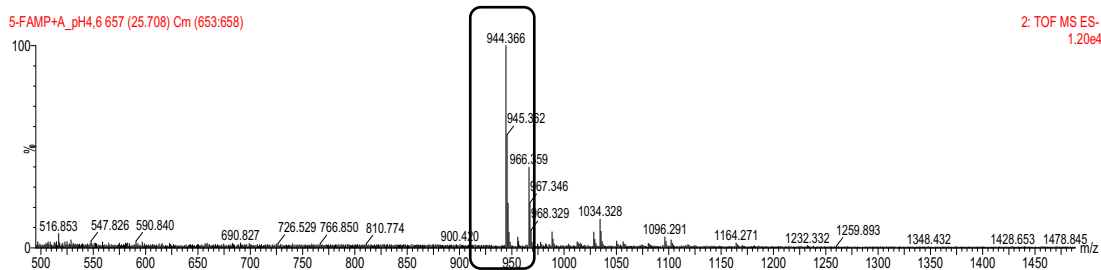
Pic 1: FKAx1



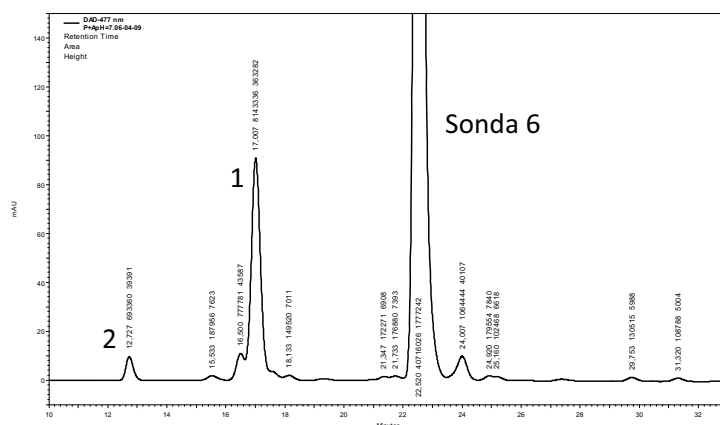
Pic2: FKAx2



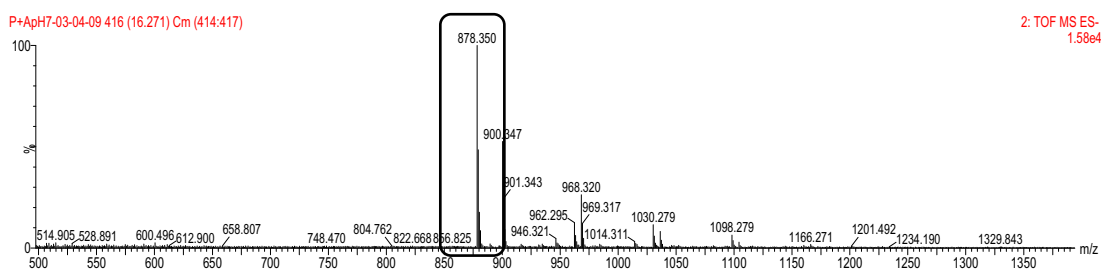
Pic 3: Oxidació del pèptid 7



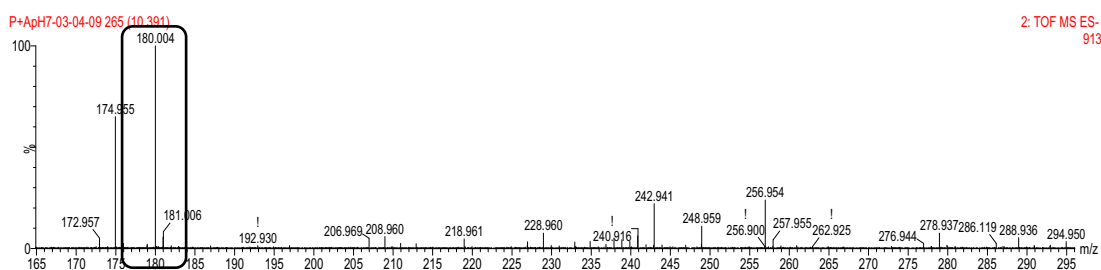
Reacció a pH 7 sonda 6 + amoxicil·lina



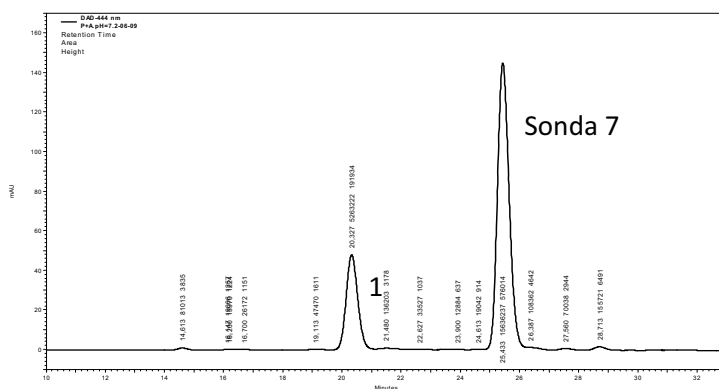
Pic 1: Oxidació del pèptid 6

2: TOF MS ES-
1.58e4HRMS:(-ESI): m/z calculat per a $C_{36}H_{52}N_{11}O_{13}S$ $[M - H]^-$ 878.3467, trobat 878.3500.

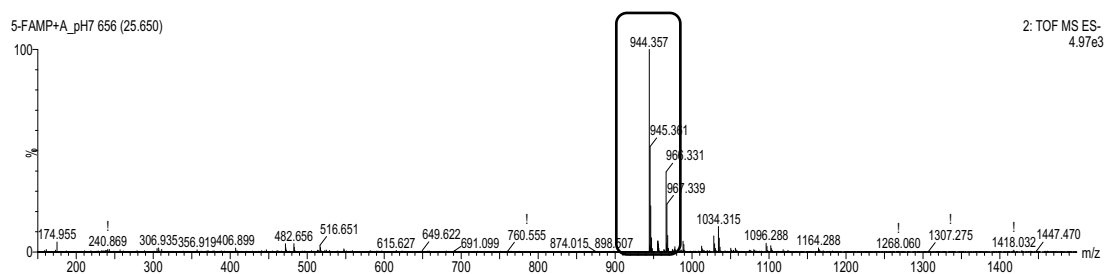
Pic 2: Hidròlisi del cromòfor NBD

2: TOF MS ES-
913HRMS:(-ESI): m/z calculat per a $C_6H_2N_3O_4$ $[M - H]^-$ 180.0045, trobat 180.0043.

Reacció a pH 7 sonda 7 + amoxicil·lina

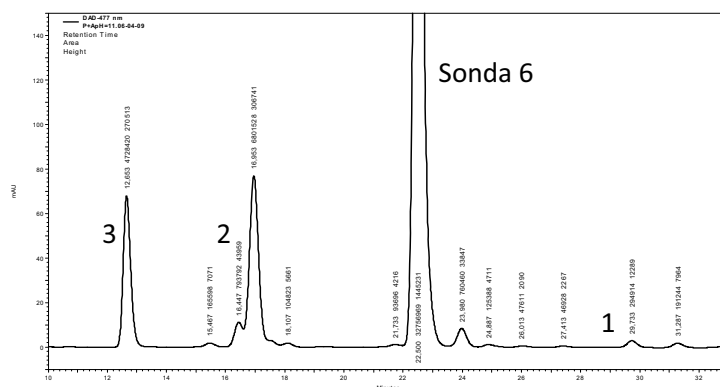


Pic 1: Oxidació del pèptid 7

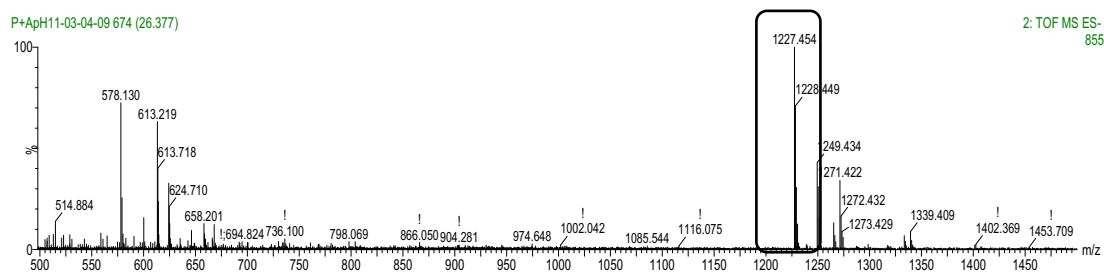


HRMS:(-ESI): m/z calculat per a $C_{46}H_{54}N_7O_{13}S [M - H]^-$ 944.3500, trobat 944.3578.

Obtenció de l'adducte amoxicil·línic a pH 11 utilitzant el pèptid 6

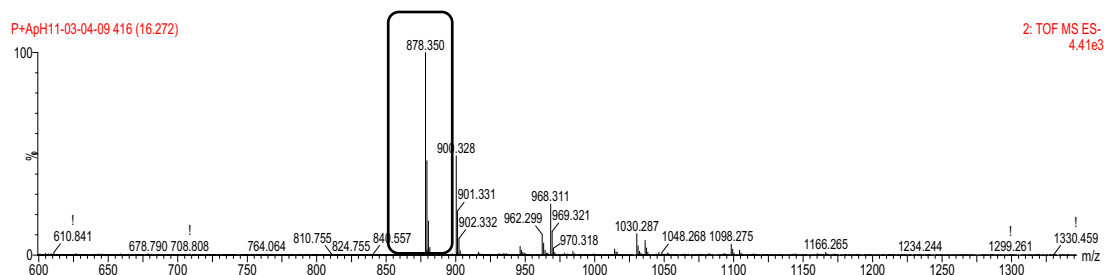


Pic 1: NKAx3



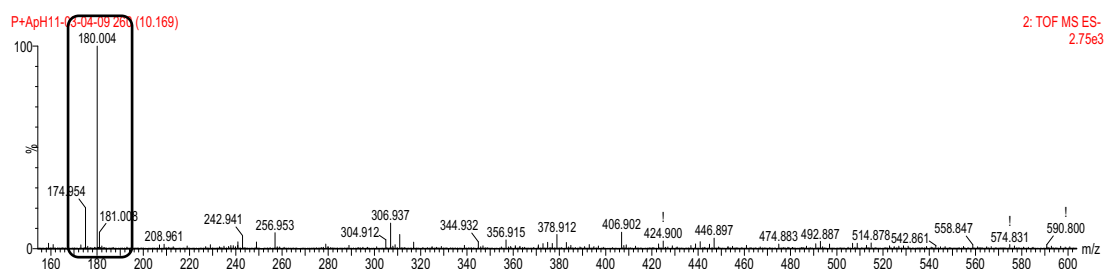
HRMS: (-ESI): m/z calculat per a $C_{52}H_{71}N_{14}O_{17}S_2 [M - H]^-$ 1227.4563, trobat 1227.4545.

Pic 2: Oxidació del pèptid 6



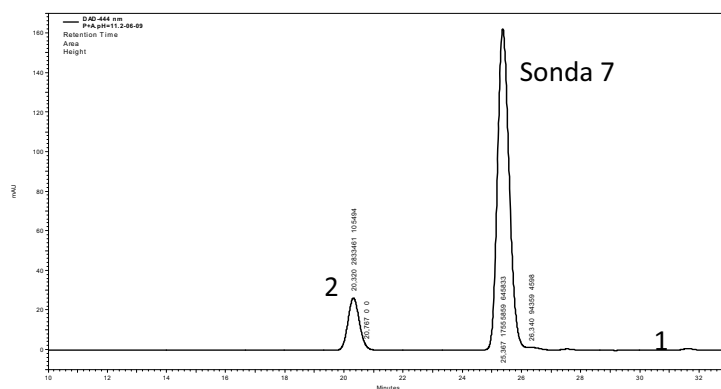
HRMS: (-ESI): m/z calculat per a $C_{36}H_{52}N_{11}O_{13}S [M - H]^-$ 878.3467, trobat 878.3500.

Pic 3: Hidròlisi del cromòfor NBD

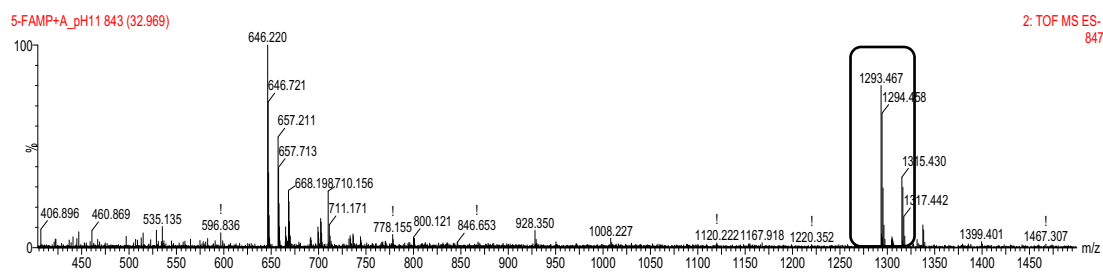


HRMS: (-ESI): m/z calculat per a $C_6H_2N_3O_4 [M - H]^-$ 180.0045, trobat 180.0040.

Obtenció de l'adducte amoxicil·línic a pH 11 utilitzant el pèptid 7

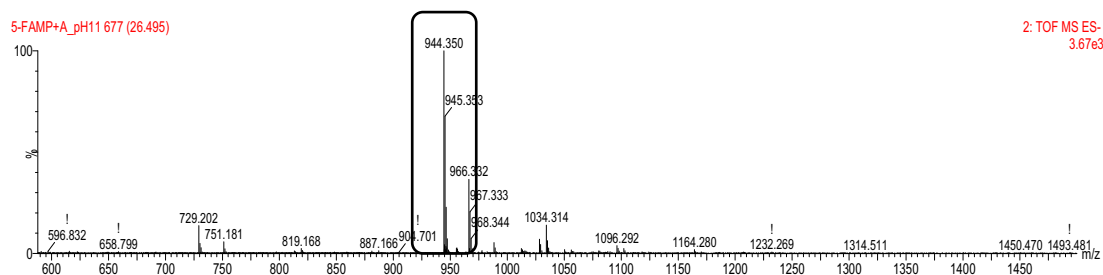


Pic 1: FKAx3



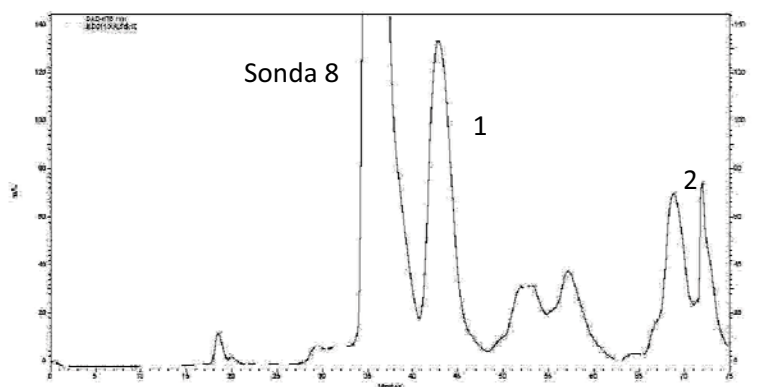
HRMS:(-ESI): m/z calculat per a $C_{63}H_{77}N_{10}O_{16}S_2$ $[M - H]^-$ 1293.4960, trobat 1293.4669.

Pic 2: Oxidació del pèptid 7

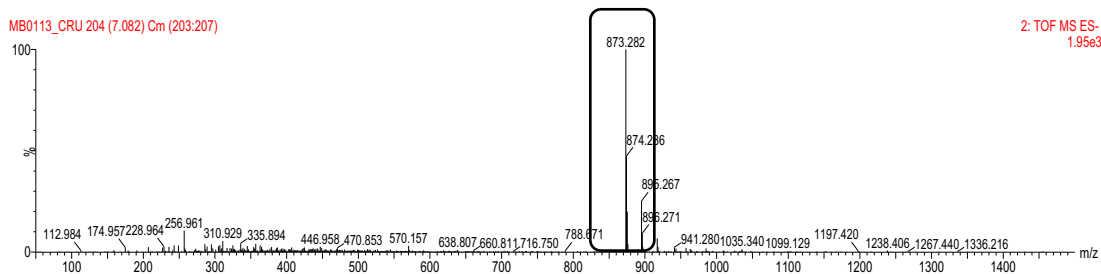


HRMS:(-ESI): m/z calculat per a $C_{46}H_{54}N_7O_{13}S$ $[M - H]^-$ 944.3500, trobat 944.3502.

Obtenció dels adductes amoxicil·línics a pH 4.6 utilitzant el pèptid 8

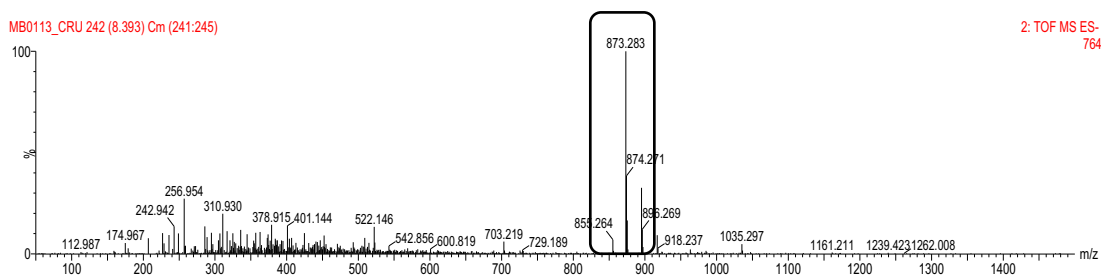


Pic 1: Adducte 1



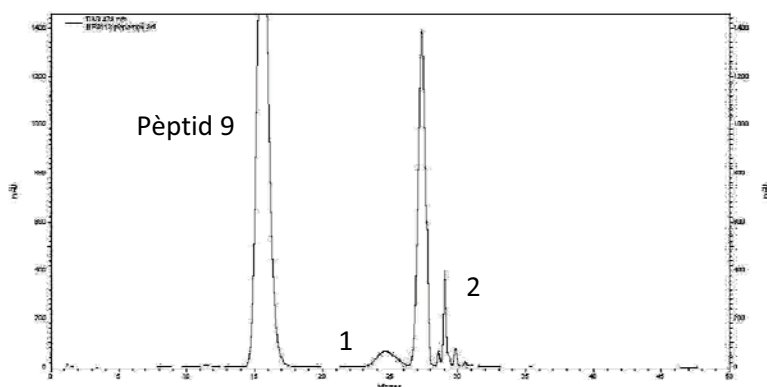
HRMS(-ESI): m/z calculat per a $C_{36}H_{45}N_{10}O_{14}S [M - H]^-$ 873.2837, trobat 873.2826.

Pic 2: Adducte 2

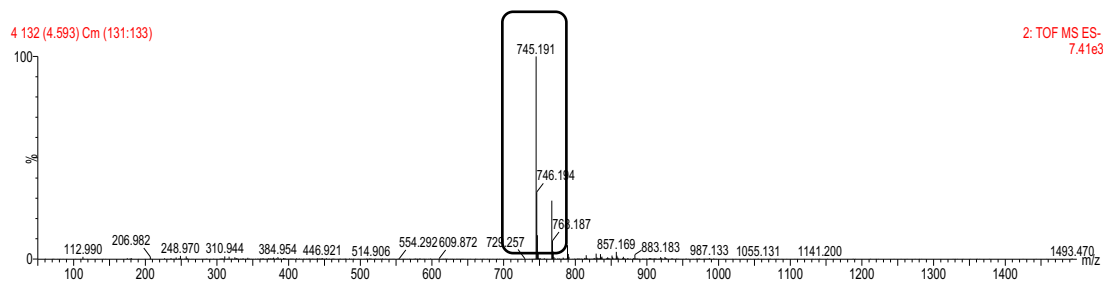


HRMS(-ESI): m/z calculat per a $C_{36}H_{45}N_{10}O_{14}S [M - H]^-$ 873.2837, trobat 873.2837.

Obtenció dels adductes amoxicil·línics a pH 4.6 utilitzant el pèptid 9

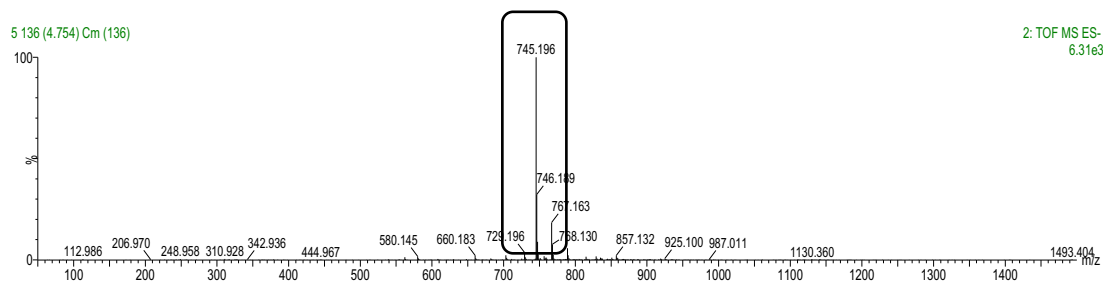


Pic 1: Adducte 1



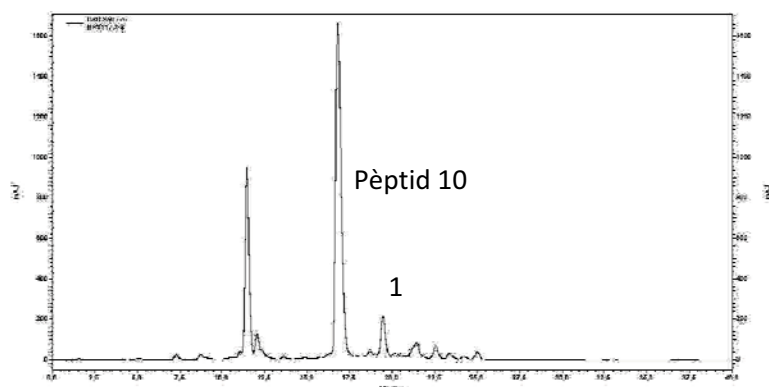
HRMS(-ESI): m/z calculat per a $C_{30}H_{33}N_8O_{13}S [M - H]^-$ 745.1888, trobat 745.1888.

Pic 2: Adducte 2

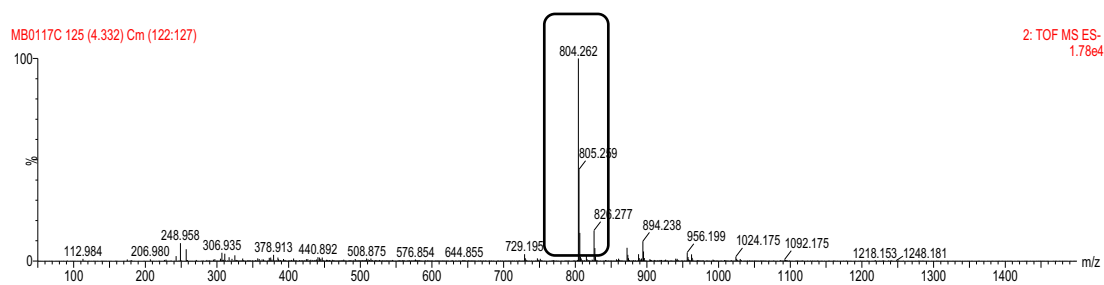


HRMS(-ESI): m/z calculat per a $C_{30}H_{33}N_8O_{13}S [M - H]^-$ 745.1888, trobat 745.1909

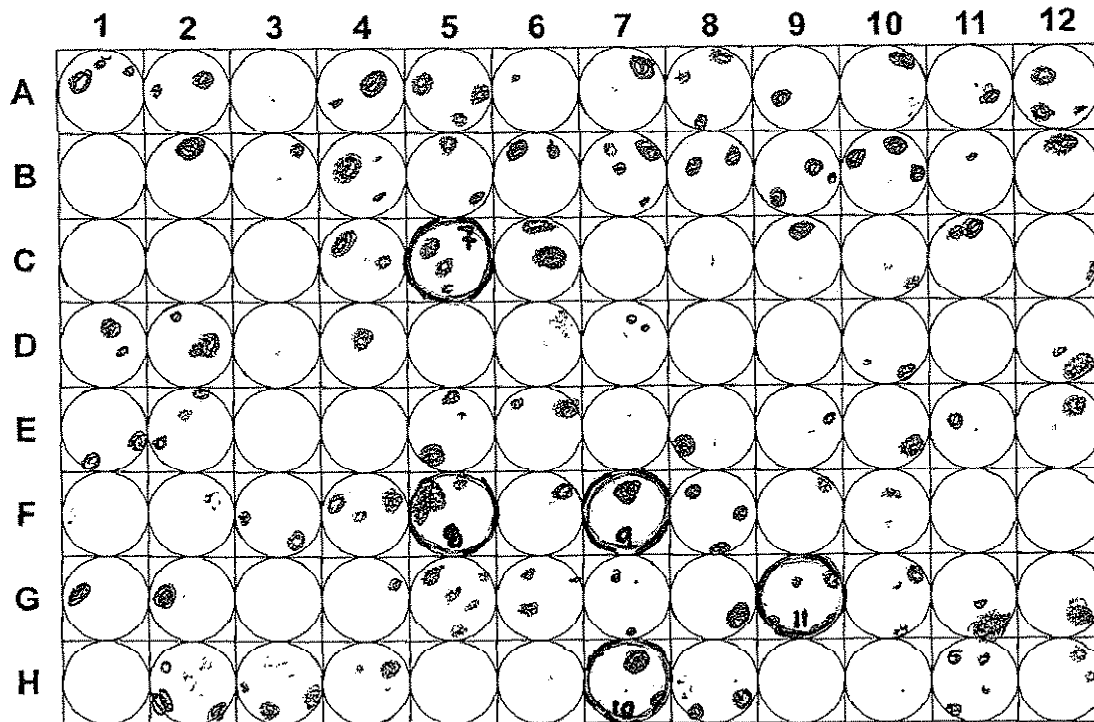
Obtenció de l'adducte amoxicil·línic a pH 4.6 utilitzant el pèptid 10

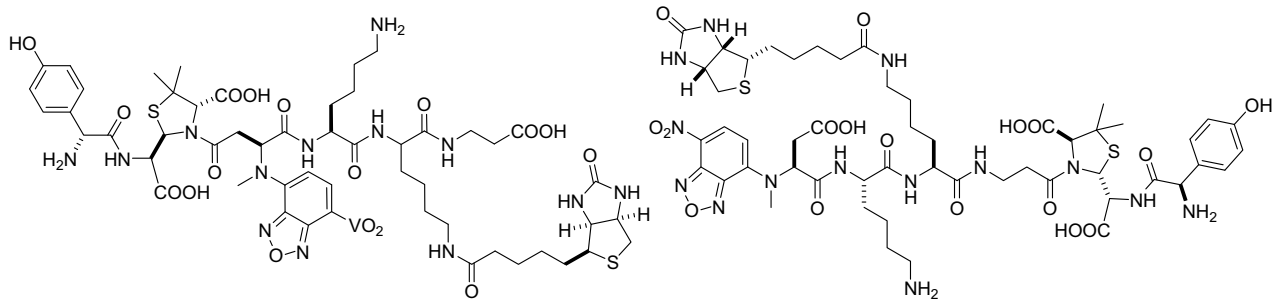


Pic 1: Adducte 1



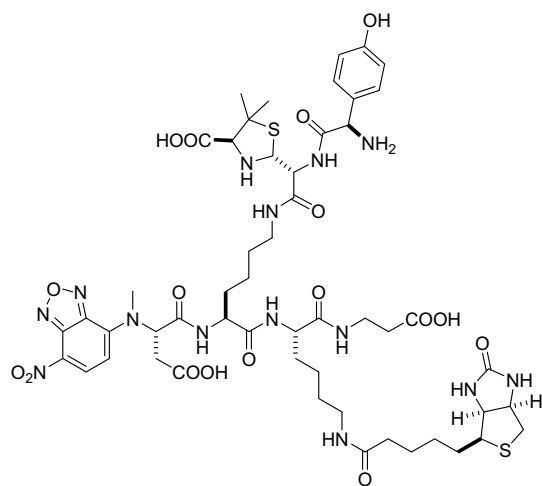
HRMS(-ESI): m/z calculat per a $C_{33}H_{41}N_9O_{13}S$ $[M - H]^-$ 804.2623, trobat 804.2627.

Annex 3. Cartografia dels clons productors de MAb.

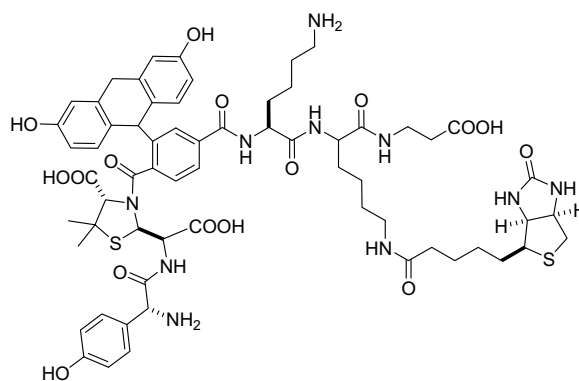


11

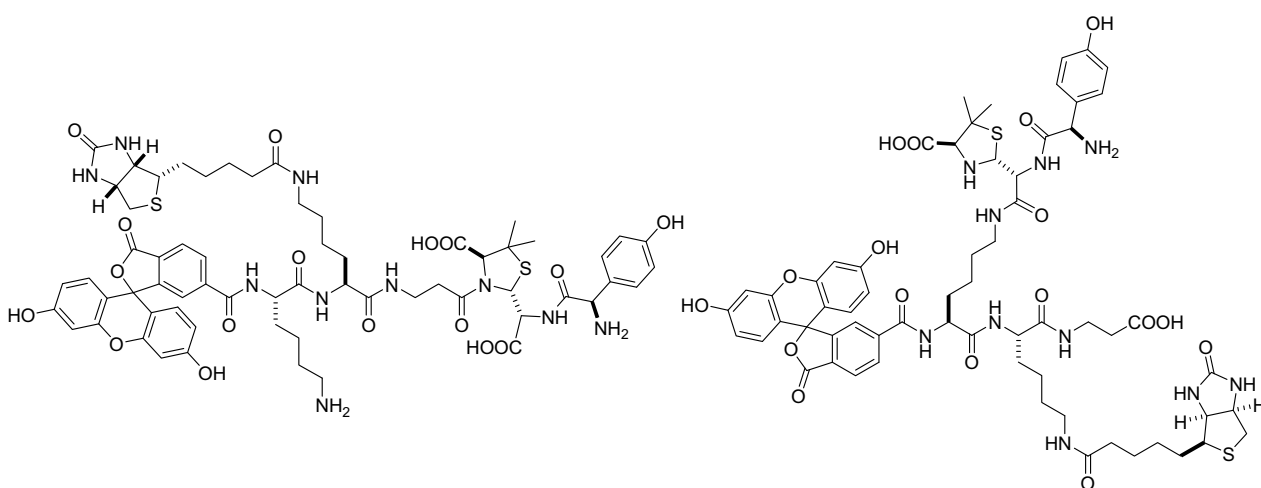
12



13

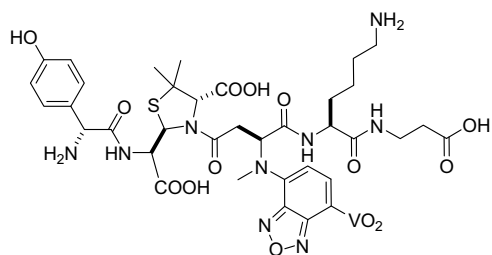


14

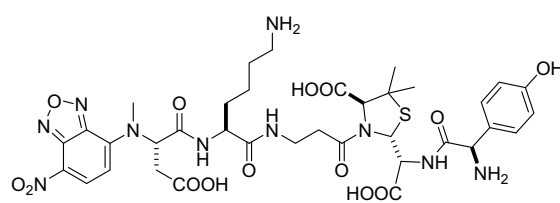


15

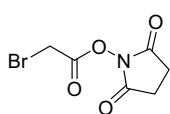
16



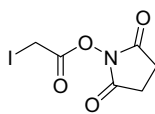
17



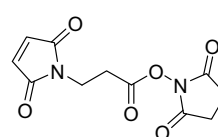
18



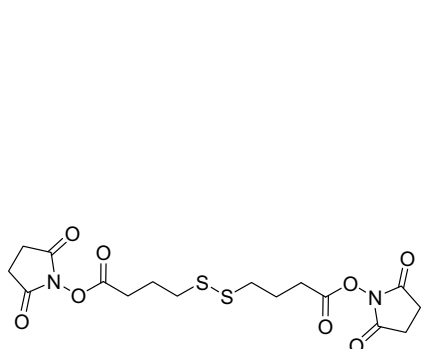
19



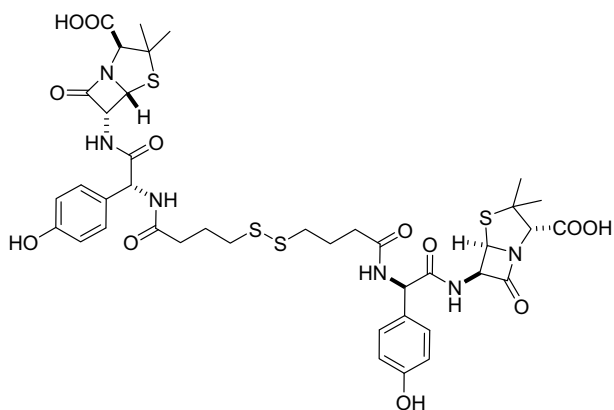
20



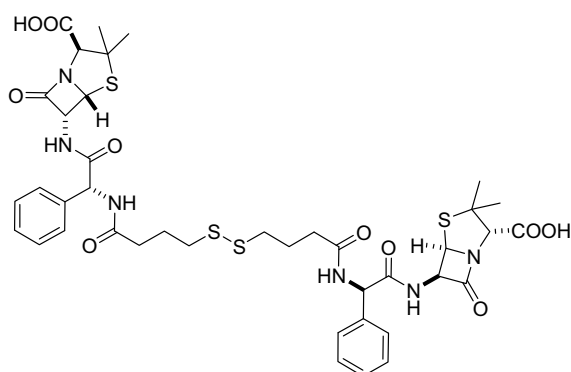
21



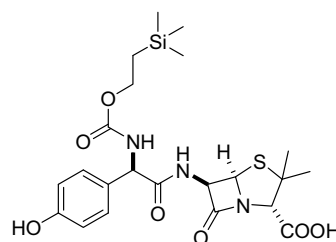
22



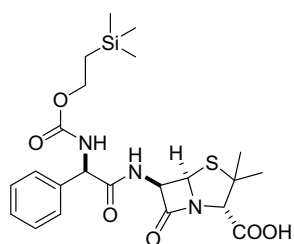
23



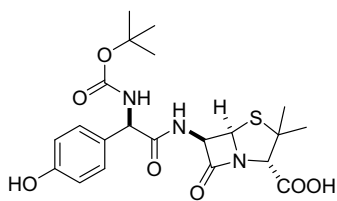
24



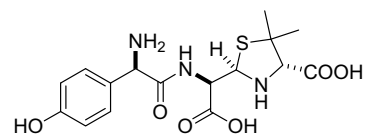
25



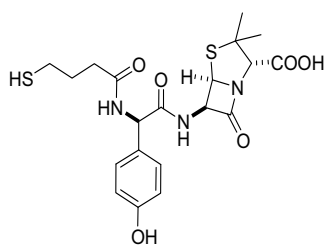
26



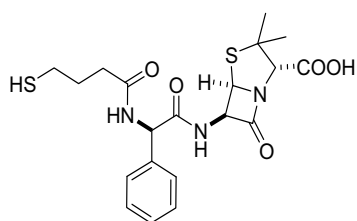
27



28



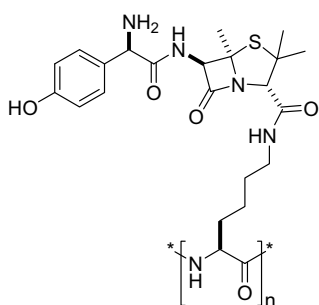
29



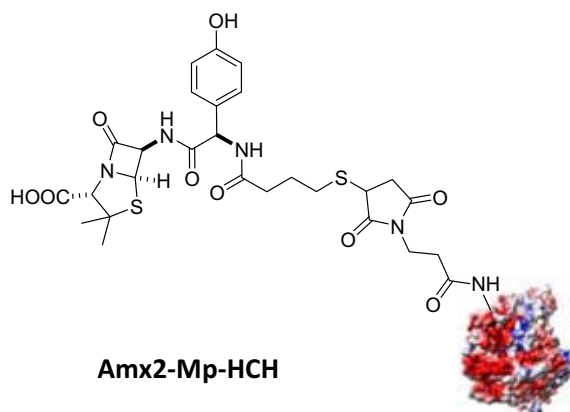
30

Annex 5. Índex de bioconjugats.

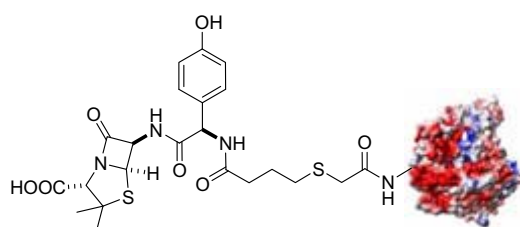
IMMUNÒGENS



Amx1-PLL

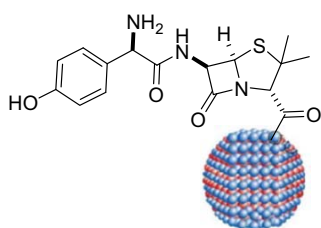


Amx2-Mp-HCH

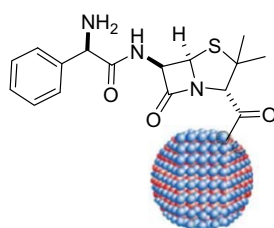


Amx2-Br-HCH

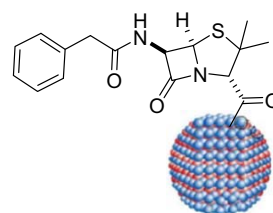
ANTÍGENS DE TIPUS 1



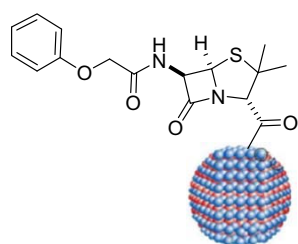
Amx1-AD



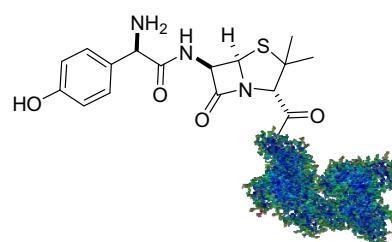
Amp1-AD



PenG-AD

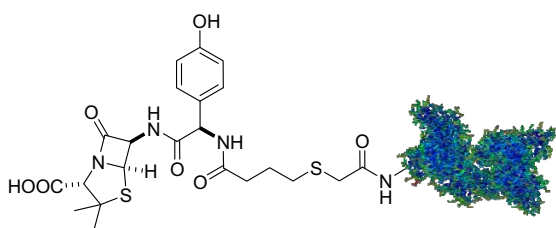


PenV-AD

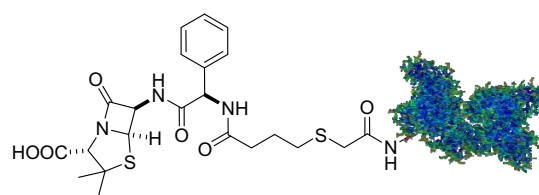


Amx1-BSA

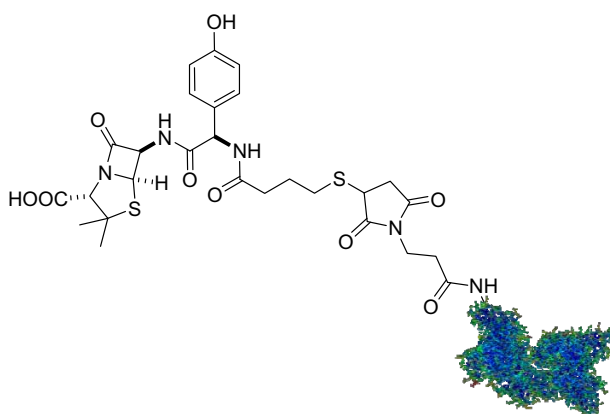
ANTÍGENS DE TIPUS 2



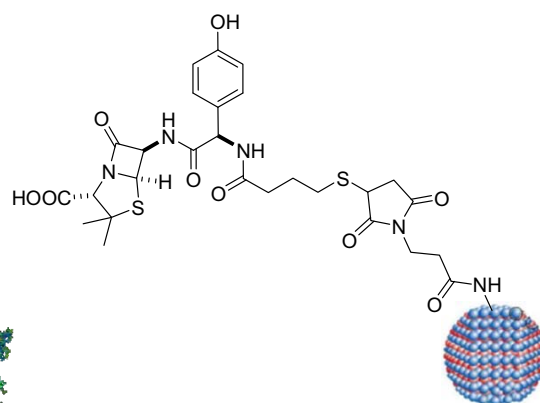
Amx2-Br/I-BSA



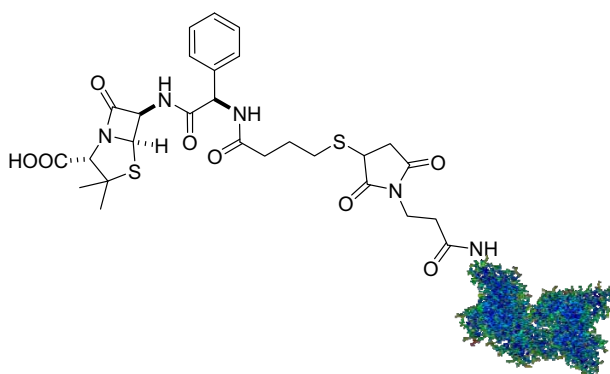
Amp-Br/I-BSA



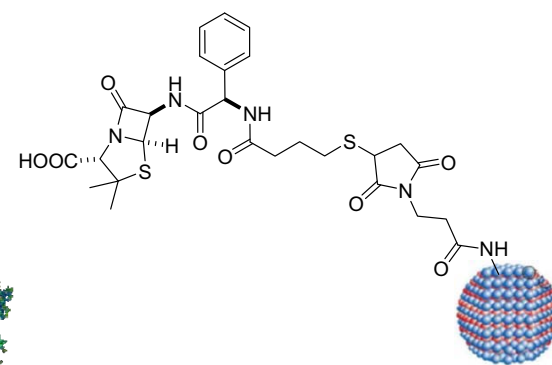
Amx2-Mp-BSA



Amx2-Mp-AD

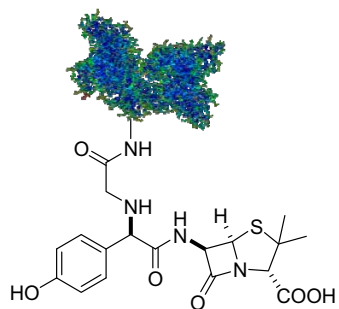


Amp2-Mp-BSA



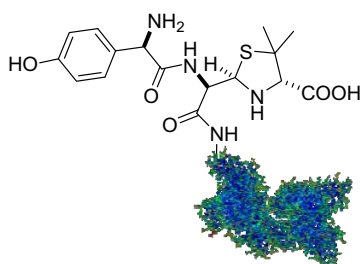
Amp2-Mp-AD

ANTIGEN DE TIPUS 3

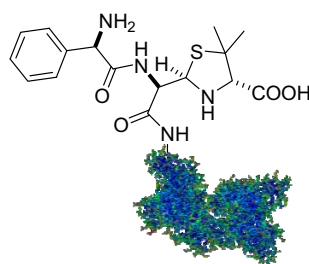


Amx3-I-BSA

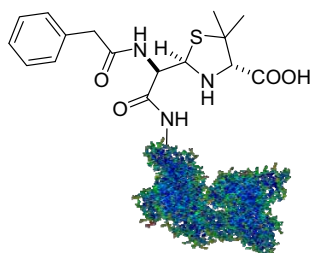
ANTÍGENS DE TIPUS 4



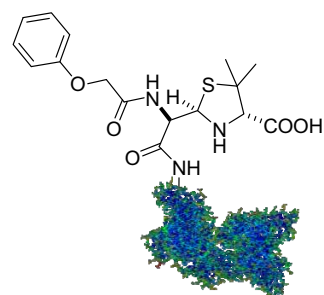
Amx4-BSA



Amp4-BSA

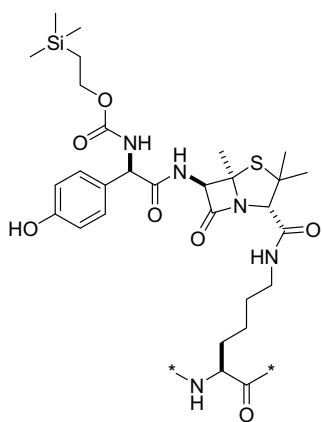


PenG4-BSA

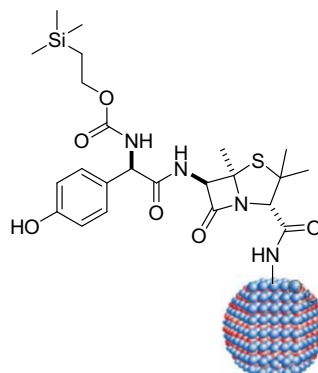


PenV4-BSA

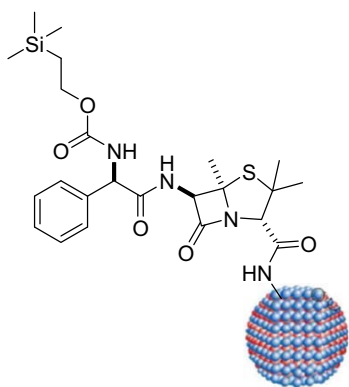
CONJUGATS INTERMEDIIS



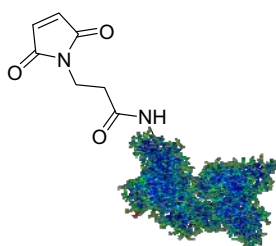
Amx1(Teoc)-PLL



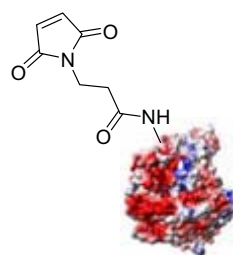
Amx1(Teoc)-AD



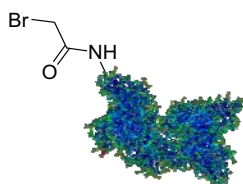
Amp1(Teoc)-AD



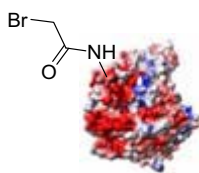
Mp-BSA



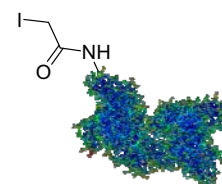
Mp-HCH



Br-BSA



Br-HCH



I-BSA

Descripció dels sèrums específics de pacients al·lèrgics a penicil·lines utilitzats en aquest treball.

Sèrum núm.	Volum de la mostra (mL)	Temps entre la reacció i l'estudi (mesos)	Gènere del pacient	Edat del pacient (anys)	Síntomes clínics	Test de pell	Test de detecció d'IgEs	Diagnòstic
1	2.1	6	mascle	33	Angioedema facial, urticària generalitzada i edema de glotis en dues ocasions	Positiu per PPL i MDM	Negatiu per amoxicil·lina, ampicil·lina, peniciloil V i peniciloil G	Hipersensibilitat a antibiòtics β-lactàmics
2	2.4	14	mascle	23	Anafilaxi en el curs d'administració d'amoxicil·lina i metamazol	Positiu per penicil·lina G, amoxicil·lina i PPL	Negatiu per amoxicil·lina, ampicil·lina, peniciloil V i peniciloil G	Hipersensibilitat a antibiòtics β-lactàmics
3	1.4	3	mascle	42	Xoc anafilàctic amb l'administració d'amoxicil·lina (triptasa i histamina elevada). Anteriorment reacció de prujja, eritema i dispnea amb amoxicil·lina	Positiu per amoxicil·lina	Negatiu per amoxicil·lina, ampicil·lina, peniciloil V i peniciloil G	Hipersensibilitat a antibiòtics β-lactàmics
4	2.0	17	femella	25	Anafilaxi als pocs minuts de prendre amoxicil·lina	Positiu per amoxicil·lina	Negatiu per amoxicil·lina, ampicil·lina, peniciloil V i peniciloil G	Hipersensibilitat a amoxicil·lina
5	2.2		mascle	43	Prujja palmo-plantar, angioedema palpebral, eritema facial i dispnea als 10 minuts de l'administració d'amoxicil·lina	Positiu per amoxicil·lina	Negatiu per amoxicil·lina, ampicil·lina, peniciloil V i peniciloil G	Hipersensibilitat a amoxicil·lina
6	1.2		femella	59	Anafilaxi immediatament després de l'administració de bencilpenicil·lina	Positiu per PPL i MDM	Positiu per amoxicil·lina (11.6 KU/L), ampicil·lina (16.8 KU/L), peniciloil V (11.3 KU/L) i peniciloil G (3.45 KU/L)	Anafilaxi a amoxicil·lina
7	2.8		femella	37	Anafilaxi	Positiu per epnicil·lina i amoxicil·lina	Negatiu per amoxicil·lina, ampicil·lina, peniciloil V i peniciloil G	Hipersensibilitat a penicil·lines

ANNEX 7. Document d'informació i conformitat pels pacients donants de sèrum.**INFORMACION PARA EL PACIENTE****Título del estudio: "MICROARRAY DE EPITOPOS: UNA HERRAMIENTA PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA INVESTIGACIÓN DE LAS RESPUESTAS A ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS"**

El objetivo de esta información es ayudarle a tomar una decisión sobre su participación o no en este estudio.

La alergia a penicilinas y derivados (en general antibióticos beta-lactámicos) es una de las más frecuentes en los casos de alergia a medicamentos.

Actualmente no existen pruebas de laboratorio suficientemente sensibles que permitan realizar un diagnóstico correcto, lo que obliga en la mayoría de los casos a efectuar pruebas cutáneas y de exposición controlada a dosis crecientes del fármaco en los pacientes.

Se ha diseñado un análisis de laboratorio basado en una nueva tecnología (microarrays) con el objetivo de poder diagnosticar la alergia a antibióticos beta-lactámicos utilizando únicamente suero del paciente supuestamente alérgico.

Para conseguir su estandarización es necesario la utilización de sueros de pacientes con alergia demostrada a estos antibióticos, como es su caso.

Si usted acepta a participar en este proyecto, se le extraerá una muestra de sangre para obtener suero, el cual se remitirá al "Instituto de investigaciones químicas y ambientales de Barcelona "Josep Pascual Vila" (IIQAB) que es donde se realizará el estudio.

Estos sueros estarán debidamente codificados, lo que garantizará la confidencialidad de sus datos personales, que en ningún caso serán conocidos por el equipo investigador. Asimismo debe reseñarse que dichas muestras solo serán utilizadas para dicho proyecto y que una vez completado el estudio el suero sobrante será destruido.

La implementación de esta nueva técnica permitirá un diagnóstico más rápido y preciso y reducirá los riesgos potenciales que conlleva para los pacientes el estudio actual basado en pruebas cutáneas y de exposición.

20 de Febrer de 2008

Hospital Universitari de Bellvitge
 Feixa Llarga s/n
 08907 L'Hospitalet de Llobregat
 Tel. 932 607 500
 Fax 932 607 561
 www.csub.scs.es

- [1] WHO, T.R.S. (1972) WHO International drug monitoring: the role of nature centres. **498**.
- [2] Laurence, D., Carpenter, J. (1998) A dictionary of pharmacology and allied topics. *2nd Ed., Amsterdam: Elsevier*: 8-9.
- [3] Stephens, M., Talbot, J., Routledge, P. (1998) Definitions and classifications of adverse reaction terms. The detection of new adverse reactions. *4th edn. London Macmillan Reference*: 32-44.
- [4] Edwards, I.R., Aronson, J.K. (2000) Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet* **356**: 1255-1259.
- [5] Rawlins, M.D., Thompson, J.W. (1977) Pathogenesis of adverse drug reactions In; Davies DM, ed. Textbook of adverse drug reactions. *Oxford University Press*: 10.
- [6] Grahame-Smith, D.G., Aronson, J.K. (1984) Adverse drug reactions. In: The Oxford textbook of clinical pharmacology and drug therapy. *Oxford: Oxford University Press*: 132–157.
- [7] Royer, R.J. (1997) Mechanism of action of adverse drug reactions: an overview. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* **6** 43–50.
- [8] Uetrecht, J. (2007) Idiosyncratic Drug Reactions: Current Understanding. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **47**: 513–539.
- [9] Uetrecht, J.P. (1992) The role of leukocyte-generated reactive metabolites in the pathogenesis of idiosyncratic drug reactions. *Drug Metabolism Reviews* **24**: 299–366.
- [10] Park, K., Williams, D.P., Naisbitt, D.J., Kitteringham, N.R., Pirmohamed, M. (2005) Investigation of toxic metabolites during drug development. *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**: 425–434.
- [11] Clay, K.D., Hanson, J.S., Pope, S.D., Rissmiller, R.W., Purdum, P.P., Banks, P.M. (2006) Brief communication: severe hepatotoxicity of telithromycin: three case reports and literature review. *Annals of International Medicine* **144**: 415–420.
- [12] Hyson, C., Sadler, M. (1997) Cross sensitivity of skin rashes with antiepileptic drugs. *Canadian Journal of Neurological Sciences* **24**: 245–249.
- [13] Shear, N.H., Spielberg, S.P. (1988) Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* **82**: 1826–1832.
- [14] Landsteiner, K., Somma, A.A.D. (1938) Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. . *The Journal of Experimental Medicine* **68**: 505-512.
- [15] Langman, R.E., Cohn, M. (2000) Self-nonsel self discrimination revisited *Seminars in Immunology* **12**: 159–162.
- [16] Parker, C.W., Weck, A.L.D., Kern, M., Eisen, H.N. (1962) The preparation and some properties of penicillenic acid derivatives relevant to penicillin hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine* **115**: 803–819.
- [17] Bretscher, P., Cohn, M. (1970) A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* **169**: 1042–1049.
- [18] Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 991–1045.
- [19] Matzinger, P. (1998) An innate sense of danger. *Seminars in Immunology* **10**: 399–415.
- [20] Zanni, M.P., Greyerz, S.V., Schnyder, B., Brander, K.A., Frutig, K., Hari, Y., Valitutti, S., Pichler, W.J. (1998) HLA restricted, processing- and metabolism-independent pathway of drug recognition by human alphabeta T lymphocytes. . *Journal of Clinical Investigation* **102**: 1591–1598.
- [21] Pichler, W.J. (2002) Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **2**: 301–305.
- [22] Uetrecht, J. (2002) N-oxidation of drugs associated with idiosyncratic drug reactions. *Drug Metabolism Reviews* **34**: 651–665.
- [23] Choquet-Kastylevsky, G., Vial, T., Descotes, J. (2002) Allergic adverse reactions to sulfonamides. *Current Allergy and Asthma Reports* **2**: 16-25.

- [24] Lu, W., Uetrecht, J.P. (2007) Possible bioactivation pathways of lamotrigine. *Drug Metabolism and Disposition* **35**: 1050–1056.
- [25] Kindmark, A., Jawaid, A., Harbron, C.G., Barratt, B.J., Bengtsson, O.F., al., e. (2008) Genome-wide pharmacogenetic investigation of a hepatic adverse event without clinical signs of immunopathology suggests an underlying immune pathogenesis. *The Pharmacogenomics Journal* **8**: 186-195.
- [26] Yakehiro, M., Furukawa, Y., Koike, T., Kimura, E., Nakajima, T., Yamaoka, K., Seyama, I. (2001) Novel mechanism of blocking axonal Na⁺-channels by three macrocyclic polyamine analogues and two spider toxins. *British Journal of Pharmacology* **132**: 63-72.
- [27] Liu, Z.X., Govindarajan, S., Kaplowitz, N. (2004) Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* **127**: 1760-1774.
- [28] Bourdi, M., Masubuchi, Y., Reilly, T.P., Amouzadeh, H.R., Martin, J.L., George, J.W., Shah, A.G., Pohl, L.R. (2002) Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: role of inducible nitric oxide synthase. *Hepatology* **35**: 289–298.
- [29] Zimmerman, H.J. (1976) Various forms of chemically induced liver injury and their detection by diagnostic procedures. *Environmental Health Perspectives* **15**: 3-12.
- [30] Maniratanachote, R., Shibata, A., Kaneko, S., Yamamori, I., Wakasugi, T., Sawazaki, T., Katoh, K., Tokudome, S., Nakajima, M., Yokoi, T. (2005) Detection of autoantibody to aldolase B in sera from patients with troglitazone-induced liver dysfunction. *Toxicology* **216**: 15-23.
- [31] Ong, M.M., Latchoumycandane, C., Boelsterli, U.A. (2007) Troglitazone-induced hepatic necrosis in an animal model of silent genetic mitochondrial abnormalities. *Toxicological Sciences* **97**: 205-213.
- [32] Martin, A.M., Nolan, D., Gaudieri, S., Almeida, C.A., Nolan, R., James, I., Carvalho, F., Phillips, E., Christiansen, F.T., Purcell, A.W., McCluskey, J., Mallal, S. (2004) Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **101**: 4180-4185.
- [33] Chung, W.H., Hung, S.I., Hong, H.S., Hsieh, M.S., Yang, L.C., Ho, H.C., Wu, J.Y., Chen, Y.T. (2004) Medical genetics: A marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature* **428**: 486.
- [34] Hung, S.I., Chung, W.H., Liou, L.B., Chu, C.C., Lin, M., Huang, H.P., Lin, Y.L., Lan, J.L., Yang, L.C., Hong, H.S., Chen, M.J., Lai, P.C., Wu, M.S., Chu, C.Y., Wang, K.H., Chen, C.H., Fann, C.S., Wu, J.Y., Chen, Y.T. (2005) HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **102**: 4134–4139.
- [35] Lonjou, C., Thomas, L., Borot, N., Ledger, N., Toma, C.d., Lelouet, H., Graf, E., Schumacher, M., Hovnanian, A., Mockenhaupt, M., Roujeau, J.C. (2006) A marker for Stevens-Johnson syndrome . . .: Ethnicity matters. *Pharmacogenomics Journal* **6**: 265-268.
- [36] Pirmohamed, M., Park, B.K. (2001) Genetic susceptibility to adverse drug reactions. *Trends in Pharmacological Sciences* **22**: 298-305.
- [37] Valeyrie-Allanore, L., Sassolas, B., Roujeau, J.C. (2007) Drug-induced skin, nail and hair disorders. *Drug Safety* **30**: 1011–1030.
- [38] Nigen, S., Knowles, S.R., Shear, N.H. (2003) Drug eruptions: approaching the diagnosis of drug-induced skin diseases. *Journal of Drugs in Dermatology* **2**: 278–299.
- [39] Roujeau, J.C. (2006) Immune mechanisms in drug allergy. *Allergology International* **55**: 27–33.
- [40] Gomez, M.B., Torres, M.J., Mayorga, C., Perez-Inestrosa, E., Suau, R., Montañez, M.I., Juarez, C. (2004) Immediate allergic reactions to betalactams: facts and controversies. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **4**: 261–266.
- [41] Parker, C.W., Thiel, J.A. (1963) Studies in human penicillin allergy: A comparison of various penicilloyl-polylysines. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **62**: 482–491.

- [42] Sehgal, V.N., Srivastava, G. (2006) Fixed drug eruption (FDE): Changing scenario of incriminating drugs. *International Journal of Dermatology* **45**: 897–908.
- [43] Wolf, R., Matz, H., Marcos, B., Orion, E. (2005) Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms vs toxic epidermal necrolysis: the dilemma of classification. *Clinics in Dermatology* **23**: 311-314.
- [44] Björnsson, E., Olsson, R. (2005) Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology* **42**: 481-489.
- [45] Uetrecht, J. (2009) Immune-mediated adverse drug reactions. *Chemical Research in Toxicology* **22**: 24-34.
- [46] Uetrecht, J.P., Woosley, R.L. (1981) Acetylator phenotype and lupus erythematosus. *Clinical Pharmacokinetics* **6**: 118–134.
- [47] Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., Capsoni, F., Lubrano, E., Doria, A. (2005) Drug-induced lupus erythematosus. *Autoimmunity* **38**: 507–518.
- [48] Masson, M.J., Teranishi, M., Shenton, J.M., Uetrecht, J.P. (2004) Investigation of the involvement of macrophages and T cells in D-penicillamine-induced autoimmunity in the Brown Norway rat. *Journal of Immunotoxicology* **1**: 79–93.
- [49] Silverstein, A.M. (2003) Cellular versus humoral immunology: a century-long dispute. *Nature Immunology* **4**: 425–428.
- [50] Davies, D.R., Chacko, S. (1993) Antibody structure. *Accounts of Chemical Research* **26**: 421-427.
- [51] Edmundson, A.B., Guddat, L.W., Shan, L., Fan, Z.C., Hanson, B.L. (1994) Structural aspects of conformational changes in ligand binding by antibody fragments. *Research in Immunology* **145**: 56-61.
- [52] Hsu, E., Steiner, L.A. (1992) Primary structure of immunoglobulins through evolution. *Current Opinion in Structural Biology* **2**: 422-431.
- [53] Bendiner, E. (1981) Baron von Pirquet: the aristocrat who discovered and defined allergy. *Hospital Practice Journal Articles* **16**: 137–144.
- [54] Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A. (1963) The classification of allergic reactions underlying disease. In *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell Science (Coombs, R.R.A. and Gell, P.G.H., eds)
- [55] Anderson, J.A. (2007) Chapter 16. Allergic and allergic-like reactions to drugs and other therapeutic agents. *Current Clinical Practice*: 295-318.
- [56] Khan, D.A., Solensky, R. (2009) Drug allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**: 126-137.
- [57] Gruchalla, R.S. (2003) Drug allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**: 548-559.
- [58] Levy, M. (2000) Hypersensitivity to pyrazolones. *Thorax* **55**: 72-74.
- [59] Campi, P., Pichler, W.J. (2003) Quinolone hypersensitivity *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **3**: 275-281.
- [60] Wolf, G.L., Mishkin, M.M., Roux, S.G., Halpern, E.F., Gottlieb, J., Zimmerman, J., Gillen, J., Thellman, C. (1991) Comparison of the rates of adverse drug reactions. Ionic contrast agents, ionic agents combined with steroids, and nonionic agents. *Investigative Radiology* **26**: 404-410.
- [61] Chang, C., Mahmood, M., Teuber, S., Gershwin, M. (2012) Overview of Penicillin Allergy. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* **43**: 84-97.
- [62] Grillo, M.P. (2009) In *Allergic Reactions to Drugs*. John Wiley and Sons, Inc.: 629-653.
- [63] Idsoe, O., Guthe, T., Wilcox, R., deWeck, A. (1968) Nature and extent of penicillin side-reactions, with particular reference to fatalities from anaphylactic shock. *Bull WHO* **38**: 159-188.
- [64] Group, I.R.F. (1991) Allergic reactions to long-term benzathine penicillin prophylaxis for rheumatic fever. *Lancet* **337**: 1308-1310.

- [65] Neugut, A., Ghatak, A., Miller, R. (2001) Anaphylaxis in the United States: an investigation into its epidemiology. . *Archives of International Medicine* **161**: 15-21.
- [66] Levine, B.B. (1966) Immunologic mechanisms of penicillin allergy. A haptenic model system for the study of allergic disease in man. *The New England Journal of Medicine* **275**: 1115-1125.
- [67] Levine, B., Redmond, A. (1969) Minor haptenic determinant-specific reagins of penicillin hypersensitivity in man. *International Archives of Allergy and Immunology* **35**: 445-455.
- [68] Baldo, B. (1999) Penicillins and cephalosporins as allergens—structural aspects of recognition and cross-reactions. *Clinical and Experimental Allergy* **29**: 744-749.
- [69] Romano, A., Mayorga, C., Torres, M.J., Artesani, M.C., Suau, R., Sánchez, F., Pérez, E., Venuti, A., Blanca, M. (2000) Immediate allergic reactions to cephalosporins: Cross-reactivity and selective responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106**: 1177-1183.
- [70] Hamilton, R.G.: Assessment of human allergic diseases. 3rd ed. London: Elsevier 2008.
- [71] Hamilton, R.G.: Laboratory diagnosis and management of human allergic disease. 2nd ed London: Elsevier 2009.
- [72] Damin, D.A., Peebles, R.S. (2006): In vivo diagnostic allergy testing. . In *Manual of molecular and clinical laboratory immunology*. Eds. Detrick, B., Hamilton, R.G., Folds, J.D., editors, 7th ed. Washington (DC): American Society for Microbiology Press, pp. 947-954.
- [73] Nelson, H.S., Lahr, J., Buchmeier, A., McCormick, D. (1998) Evaluation of devices for skin prick testing. . *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **101**: 153-156.
- [74] <http://www.diater.com/textos/prospectoDAP.pdf>.
- [75] Belin, L.G., Norman, P.S. (1977) Diagnostic tests in the skin and serum of works sensitized to Bacillus subtilis enzymes. *Clinical Allergy* **7**: 55-68.
- [76] Aberer, W., Bircher, A., Romano, A., Blanca, M., Campi, P., Fernandez, J., Brockow, K., Pichler, W.J., Demoly, P. (2003) Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy* **58**: 854-863.
- [77] Park, B.K., Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R. (1998) Role of drug disposition in drug hypersensitivity: A chemical, molecular, and clinical perspective. *Chemical Research in Toxicology* **11**: 969-988.
- [78] Mayorga, C., Sanz, M.L., Gamboa, P.M., García, B.E. (2010) In vitro diagnosis of immediate allergic reactions to drugs: an update. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* **20**: 103-109.
- [79] Luque, I., Leyva, L., Torres, M.J., Rosal, M., Mayorga, C., Segura, J.M., Blanca, M., Juárez, C. (2001) In vitro T-cell responses to beta-lactam drugs in immediate and nonimmediate allergic reactions. *Allergy* **56**: 611-618.
- [80] Cederbrant, K., Gunnarsson, L.G., Hultman, P., Norda, R., Tibbling-Grahn, L. (1999) In vitro lymphoproliferative assays with HgCl₂ cannot identify patients with systemic symptoms attributed to dental amalgam. *J Dent Res*. **78**: 1450–1458.
- [81] Cederbrant, K., Hultman, P., Marcusson, J.A., Tibbling, L. (1997) In vitro lymphocyte proliferation as compared to patch test using gold, palladium and nickel. *International Archives of Allergy and Immunology* **112**: 212–217.
- [82] Weck, A.L.D. (1992) Perspectives in allergy diagnosis. *International Archives of Allergy and Immunology* **99**: 252-256.
- [83] Weck, A.L.D., Stadler, B.M., Urwyler, A., Wehner, H.U., Bühlmann, R.P. (1993) Cellular Allergen Stimulation Test – A new dimension in allergy diagnosis. *ACI News* **5**: 9-14.
- [84] Furukawa, K., Tengler, R., Weck, A.L.d., Maly, F.E. (1994) Simplified sulfidoleukotriene ELISA using LTD₄- conjugated phosphatase for the study of allergen-induced leukotriene generation by isolated mononuclear cells and diluted whole blood. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* **4**: 110-115.

- [85] Garcia-Avilés, C., Sanz, M.L., Gamboa, P.M., Urrutia, I., Antépara, I., Jauregui, I., Weck, A.L.d. (2005) Antigen specific quantification of sulfidoleukotrienes in patients allergic to Betalactam antibiotics. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* **15**: 37-45.
- [86] Torres, M.J., Blanca, M., Fernandez, J., Romano, A., Weck, A.d., Aberer, W., Brockow, K., Pichler, W.J., Demoly, P. (2003) Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy* **58**: 961-972.
- [87] Sanz, M.L., Gamboa, P.M., Weck, A.L.D. (2007) In vitro tests: Basophil Activation Tests. *Drug Hypersensitivity*: 391-402.
- [88] Weck, A.L.d., Sanz, M.L. (2004) Cellular Allergen Stimulation Test (CAST). *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* **14**: 253-273.
- [89] Wide, L., Bennich, H., Johansson, S.G.O. (1967) Diagnosis by an in vitro test for allergen specific IgE antibodies. *Lancet* **2**: 1105-1109.
- [90] Matsson, P., Hamilton, R.G., Esch, R.E., Halsey, J.F., Homburger, H.A., Kleine-Tebbe, J., et-al. (2009) Analytical performance characteristics and clinical utility of immunological assays for human immunoglobulin E antibodies of defined allergen specificities. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* **29 I/LA20-A2**.
- [91] www.phadia.com.
- [92] Macy, E., Goldberg, B., Poon, K.-Y.T. (2010) Use of commercial anti-penicillin IgE fluorometric enzyme immunoassays to diagnose penicillin allergy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* **105**: 136-141.
- [93] Zidarn, M., Silar, M., Vegnuti, M., Korošec, P., Košnik, M. (2009) The specificity of tests for anti- β -lactam IgE antibodies declines progressively with increase of total serum IgE. *Wiener Klinische Wochenschrift. The Middle European Journal of Medicine* **121**: 353-356.
- [94] Vultaggio, A., Matucci, A., Virgiliw, G., Rossi, O., Fili'z, L., Parronchi, P., Romagnani, S., Maggi, E. (2009) Influence of total serum IgE levels on the in vitro detection of b-lactams-specific IgE antibodies. *Clinical et Experimental Allergy* **39**: 838-844.
- [95] Fontaine, C., Mayorga, C., Bousquet, P.J., Arnoux, B., Torres, M.-J., Blanca, M., Demoly, P. (2007) Relevance of the determination of serum-specific IgE antibodies in the diagnosis of immediate b-lactam allergy. *Allergy* **62**: 47-52.
- [96] www.siemens.com.
- [97] Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (2005) Microbiology. *McGraw-Hill Higher Education*.
- [98] Foley, E.G., Lee, S.W., Epstein, G.A. (1945) The effect of penicillin on staphylococci and streptococci commonly associated with bovine mastitis. *Journal of Milk and Food Technology* **8**: 129-133.
- [99] Mitchell, J.M., Griffiths, M.W., McEwen, S.A., McNab, W.B., Yee, A.J. (1998) Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *Journal of Food Protection* **61**: 742-756.
- [100] Jones, G.M., Bailey, T.L. (2009) Understanding the basics of mastitis. *Virginia Tech*.
- [101] Thavarungkul, P., Dawan, S., Kanatharana, P., Asawatreratanakul, P. (2007) Detecting penicillin G in milk with impedimetric label-free immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **23**: 688-694.
- [102] Yamaki, M., Berruga, M.I., Althaus, R.L., Molina, M.P., Molina, A. (2004) Occurrence of Antibiotic Residues in Milk from Manchega Ewe Dairy Farms. *Journal of Dairy Science* **87**: 3132-3137.
- [103] Korycka-Dahl, M., Richardson, T., Jr, R.L.B. (1985) Use of Microbial b-Lactamase to Destroy Penicillin Added to Milk. *Journal Of Dairy Science* **68**: 1910-1916.
- [104] Lee, M.Z.P., Richardson, T. (1987) Preparation and Characterization of Immobilized b-lactamase for Destruction of Penicillin in Milk. *Journal Of Dairy Science* **70**: 2032-2039.

- [105] Majaharju, J., Tenkanen, T., Heinonen, K. (2001) *Enzyme Composition for Treatment of Milk*. WO2001067879A1.
- [106] Hunter, G.J.E. (1949) The effect of penicillin in milk on the manufacture of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* **16**: 235-241.
- [107] Wilkowske, H.H., Krienke, W.A. (1951) Influence of Penicillin on the Lactic Acid Production of Certain Lactobacilli. *Journal of Dairy Science* **34**: 1030-1033.
- [108] Agency, E.M. (2008) Committee for veterinary medicinal products. Penicillins. Summary report. *European Medicines Agency, London*.
- [109] Anifantakis, E.M. (1982) Excretion Rates of Antibiotics in Milk of Sheep and Their Effect on Yogurt Production. *Journal of Dairy Science* **65**: 426-429.
- [110] Babington, R., Matas, S., Marco, M.P., Galve, R. (2012) Current bioanalytical methods for detection of penicillins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**: 1549-1566.
- [111] Anonymous (2000) Water Framework Directive 2000/60/EC. *Official Journal of European Communities*.
- [112] Halling-Sørensen, B. (2000) Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere* **40**: 731-739.
- [113] Halling-Sørensen, B. (2001) Inhibition of Aerobic Growth and Nitrification of Bacteria in Sewage Sludge by Antibacterial Agents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **40**: 451-460.
- [114] Harris, S.J., Cormican, M., Cummins, E. (1985) Antimicrobial Residues and Antimicrobial-Resistant Bacteria: Impact on the Microbial Environment and Risk to Human Health-A Review. *Human and Ecological Risk Assessment* **18**: 767-809.
- [115] Richardson, S.D., Ternes, T.A. (2011) Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry* **83**: 4614-4648.
- [116] Campagnolo, E.R., Johnson, K.R., Karpati, A., Rubin, C.S., Kolpin, D.W., Meyer, M.T., Esteban, J.E., Currier, R.W., Smith, K., Thu, K.M., McGeheh, M. (2002) Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *The Science of The Total Environment* **299**: 89-95.
- [117] Mojica, E.R.E., Aga, D.S. (2011) Antibiotics Pollution in Soil and Water: Potential Ecological and Human Health Issues. *Encyclopedia of Environmental Health Elsevier: Burlington*: 97-110.
- [118] Anonymous (1990) Council Regulation 2377/90/EC laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of European Communities*.
- [119] Anonymous (1996) Council Directive 96/23/EC on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of European Communities*.
- [120] Anonymous (1997) Commission Decision 97/747/EC fixing the levels and frequencies of sampling provided for by Council Directive 96/23/EC for the monitoring of certain substances and residues thereof in certain animal products. *Official Journal of European Communities*.
- [121] Anonymous (2002) Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of European Communities*.
- [122] Neu, H.C. (1986) β -Lactam Antibiotics: Structural Relationships Affecting in Vitro Activity and Pharmacologic Properties. *Reviews of Infectious Diseases*. (ArticleType: research-article / Issue Title: Supplement 3. Evaluation of New β -Lactam Antibiotics / Full publication date: Jul. - Aug., 1986 / Copyright © 1986 Oxford University Press): S237-S259.
- [123] Handsfield, H.H., Clark, H., Wallance, J.F., Holmes, K.K., Turck, M. (1973) Amoxicillin, a New Penicillin Antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **3**: 262-265.

- [124] Zimmermann, W. (1980) Penetration of beta-lactam antibiotics into their target enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a highly sensitive mutant with its parent strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **18**: 94-100.
- [125] Mediavilla, A., Garcia-Lobo, J.M. (2001) Antibioticos [Beta]-lactamicos, in *Farmacologia Humana*. MASSON, S.A.: 1085-1106.
- [126] Elander, R.P. (2003) Industrial production of [beta]-lactam antibiotics. *Applied Microbiology Biotechnology* **61**: 385-392.
- [127] Benito-Peña, E., Urraca, J.L., Moreno-Bondi, M.C. (2009) Quantitative determination of penicillin V and amoxicillin in feed samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **49**: 289-294.
- [128] Kirchmann, E., Welch, L.E. (1993) High-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of penicillins. *Journal of Chromatography A* **633**: 111-118.
- [129] Liu, C., Wang, H., Jiang, Y., Du, Z. (2011) Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. **879**: 533-540.
- [130] Cliquet, P., Cox, E., Dorpe, C.V., Schacht, E., Goddeeris, B.M. (2001) Generation of Class-Selective Monoclonal Antibodies Against the Penicillin Group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 3349-3355.
- [131] Samsonova, Z.V., Shchelokova, O.S., Ivanova, N.L., Rubtsova, M.Y., Egorov, A.M. (2005) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Ampicillin in Milk. *Applied Biochemistry and Microbiology* **41**: 589-595.
- [132] Zhang, Y., Jiang, Y., Wang, S. (2010) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect benzylpenicilloic acid, a degradation product of penicillin G in adulterated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 8171-8175.
- [133] Bacigalupo, M.A., Meroni, G., Secundo, F., Lelli, R. (2008) Time-resolved fluoroimmunoassay for quantitative determination of ampicillin in cow milk samples with different fat contents. *Talanta* **77**: 126-130.
- [134] Benito-Peña, E., Moreno-Bondi, M.C., Orellana, G., Maquieira, A., Amerongen, A.v. (2005) Development of a novel and automated fluorescent immunoassay for the analysis of β -lactam antibiotics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 6635-6642.
- [135] Strasser, A., Usleber, E., Schneider, E., Dietrich, R., Bürk, C., Märtlbauer, E. (2003) Improved enzyme immunoassay for group-specific determination of penicillins in milk. *Food and Agricultural Immunology* **15**: 135-143.
- [136] Fitzgerald, S.P., O'Loan, N., McConnell, R.I., Benchikh, E.O., Kane, N.E. (2007) Stable competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit for rapid measurement of 11 active beta-lactams in milk, tissue, urine, and serum. *Journal of AOAC International* **90**: 334-342.
- [137] Kress, C., Schneider, E., Usleber, E. (2011) Determination of penicillin and benzylpenicilloic acid in goat milk by enzyme immunoassays. *Small Ruminant Res* **96**: 160-164.
- [138] Grubelnik, A., Padeste, C., Tiefenauer, L. (2001) Highly sensitive enzyme immunoassays for the detection of beta-lactam antibiotics. *Food and Agricultural Immunology* **13**: 161-169.
- [139] Cliquet, P., Goddeeris, B.M., Bonroy, K., Cox, E. (2005) Penicillin-specific antibodies: Monoclonals versus polyclonals in ELISA and in an optical biosensor. *Food and Agricultural Immunology* **16**: 101-115.
- [140] Kloth, K., Rye-Johnsen, M., Didier, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R., Seidel, M. (2009) A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk. *Analyst* **134**: 1433-1439.
- [141] Merrifield, R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **85**: 2149-2154.

- [142] Lloyd-Williams, P., Albericio, F., Giralt, E. (1997) *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*. CRC Press, New York.
- [143] Tulla-Puche, J., Albericio, F. (2008) *The Power of Functional Resins in Organic Synthesis*. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [144] Matsueda, G.R., Stewart, J.M. (1981) A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. *Peptides* **2**: 45-50.
- [145] Goldwasser, J.M., Leznoff, C.C. (1978) The solid phase synthesis of monoester monoamides and monoester monoalcohols from symmetrical diacid chlorides. *Canadian Journal of Chemistry* **56**: 1562-1568.
- [146] Barlos, K., Gatos, D., Kallitsis, J., Papaphotiu, G., Sotiriu, P., Wenqing, Y., Schäfer, W. (1989) Darstellung geschützter peptid-fragmente unter einatz substituierter triphenylmethylharze. *Tetrahedron Letters* **30**: 3943-3946.
- [147] Barlos, K., Gatos, D., Kaposos, S., Papaphotiu, G., Schäfer, W., Wenqing, Y. (1989) Veresterung von partiell geschützten peptid-fragmenten mit harzen. Einsatz von 2-chlortritylchlorid zur synthese von Leu15- gastrin I. *Tetrahedron Letters* **30**: 3947-3950.
- [148] Bodanszky, M., Klausner, Y.S., Ondetti, N.A. (1976) *Peptide Synthesis*. Eds. E. Gross Et. J. Meienhofer, Academic Press, Y. Wiley, New York. .
- [149] Barany, G., Merrifield, R.B. (1980) Solid-phase peptide synthesis. *Peptides (New York, 1979-1987)* **2**: 1-284.
- [150] Mitchell, A.R., Kent, S.B.H., Engelhard, M., Merrifield, R.B. (1978) A new synthetic route to tert-butyloxycarbonylaminoacyl-4(oxyethyl)-phenylacetamidomethyl-resin, an improved support for solid phase peptide synthesis. *Journal of Organic Chemistry* **43**: 2845-2852.
- [151] Pugh, K.C., York, E.J., Stewart, J.M. (1992) Effects of resin swelling and substitution on solid phase synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research* **40**: 208-213.
- [152] Atherton, E., Sheppard, R.C. (1975) *Peptides 1974. Proceedings of the 13th European Peptides Symposium*. Wolman. Y., Ed. John Wiley & Sons. New York. : 123.
- [153] Atherton, E., Sheppard, R.C. (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis. Practical Approach*. IRI. Press. Oxford. : 1.
- [154] Arshady, R., Atherton, E., Clive, D.I.J., Sheppard, R.C. (1981) Peptide synthesis, part 1: Preparation and use of polar supports based on poly(dimethylacrylamide). *Journal of Chemical Society Perkin Transactions 1* **1**: 529-537.
- [155] Zalipsky, S., Albericio, F., Barany, G. *Peptides 1985, Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium*, Eds. C. M. Deber, V. J. Hruby i K. D. Kopple, Pierce, Rockford, Illinois, : 257-260.
- [156] Kates, S.A., McGuinness, B.F., Blackburn, C., Griffin, G.W., Solé, N.A., Barany, G., Albericio, F. (1998) "High-load" polyethylene glycol-polystyrene (PEG-PS) graft supports for solid-phase synthesis. *Biopolymers (Peptide Science)* **47**: 365-380.
- [157] Bayer, E., Hemmasi, B., Albert, K., Rapp, W., Dengler, M. *Peptides 1983. Proceedings of the Eighth American Peptide Symposium*, Eds. V. J. Hruby i D. H. Rich, Pierce, Rockford, Illinois, : 87-90.
- [158] Rapp, W. (1996) *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries, A Handbook*, Ed. G. Jung, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim: 425-464.
- [159] Rademan, J., Grötli, M., Meldal, M., Bock, K. (1999) Resin for solid phase organic chemistry and enzyme reactions. *Journal of the American Chemical Society* **121**: 5459-5466.
- [160] Meldal, M. (1992) PEGA: A flow stable polyethylene glycol dimethyl acrylamide copolymer for solid phase synthesis. *Tetrahedron Letters* **33**: 3077-3080.
- [161] Côte, S. (2005) *PCT Int. Appl. WO 2005012277*.
- [162] Barany, G., Kneib-Cordonier, N., Mullen, D.G. (1987) Solid-Phase Peptide Synthesis: a Silver Anniversary Report. *International Journal of Peptide and Protein Research* **30**: 705-739.
- [163] Fields, G.B., Tian, Z., Barany, G. (1992) *Synthetic Peptides. A User's Guide*; Grant, G. A. Ed: W. H. Freeman, New York: 77-183.

- [164] Songster, M.F., Barany, G.: Handles for solid-phase peptide synthesis. 1997.
- [165] Guillier, F., Orain, D., Bradley, M. (2000) Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. *Chemical Reviews* **100**: 2091-2158.
- [166] James, I.W. (1999) Linkers for solid phase organic synthesis. *Tetrahedron Letters* **55**: 4855-4946.
- [167] Bernatowicz, M.S., Daniels, S.B., Köster, H. (1989) A comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides. *Tetrahedron Letters* **30**: 4645-4648.
- [168] Albericio, F., Barany, G. (1987) An acid-labile anchoring linkage for solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions. *International Journal of Peptide and Protein Research* **30**: 206-216.
- [169] Albericio, F., Barany, G. (1985) Improved approach for anchoring Na-9-Fluorenylmethoxycarbonylamino acid as p-Alkoxybenzyl esters in solid-phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research* **26**: 92-97.
- [170] Mitchell, A.R., Erickson, B.W., Ryabtsev, M.N., Hodges, R.S., Merrifield, R.B. (1976) Tert-butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **98**: 7357-7362.
- [171] Benoiton, N.L. (1996) 2-Alkoxy-5(4H)-oxazolones and the enantiomerization of N-alkoxycarbonylamino acids. *Biopolymers (Peptide Science)* **40**: 245-254.
- [172] Merrifield, R.B. (1964) Solid-phase peptide synthesis. III. An improved synthesis of Bradykinin. *Biochemistry* **3**: 1385-1390.
- [173] Sheehan, J.C., Hess, G.P. (1955) A new method of forming peptide bonds (carbodiimide). *Journal of the American Chemical Society* **77**: 1067-1068.
- [174] Hudson, D., al., e. (1986) *Peptide Chemistry, Ed. Y. Kiso, Protein Research Foundation, Osaka*: 4113.
- [175] Sarantakis, D., Teichman, J., Lien, E.L., Fenichel, R.L. (1976) A novel cyclic undecapeptide, Wy-40,770, with prolonged growth hormone release inhibiting activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **73**: 336-342.
- [176] König, W., Geiger, R. (1970) A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives. *Chemische Berichte* **103**: 788-798.
- [177] Carpino, L.A. (1993) 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *Journal of the American Chemical Society* **115**: 4397-4398.
- [178] Carpino, L.A., El-Faham, A., Minor, C.A., Albericio, F. (1994) Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*: 201-203.
- [179] Castro, B., Dormoy, J.R., Evin, G., Selve, C. (1975) Peptide coupling reagents. IV. N-[Oxytris(dimethylamino)phosphonium]benzotriazole hexafluorophosphate. *Tetrahedron Letters* **14**: 1219-1222.
- [180] Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W., Gillissen, D. (1989) New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Letters* **30**: 1927-1930.
- [181] Stewart, J.M., Young, J.D.: Solid Phase Peptide Synthesis. Rockford 1984.
- [182] King, D.S., Fields, C.G., Fields, G.B. (1990) A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *International Journal of Protein Research* **36**: 255-266.
- [183] Dick, F. (1994): Peptide Synthesis Protocols. Eds. Pennington, M., Dunn, B.M., Totowa N. J., p. 63.
- [184] Meschkat, E., Barratt, M.D., Lepoittevin, J.P. (2001) Studies of the chemical selectivity of hapten, reactivity, and skin sensitization potency. 2. NMR studies of the covalent binding of the ¹³C-labeled skin sensitizers 2-[¹³C]- and 3-[¹³C]hex-1-ene- and 3-[¹³C]hexane-1,3-sultones to human serum albumin. *Chemical Research in Toxicology* **14**: 118-126.

- [185] Alvarez-Sánchez, R., Divkovic, M., Basketter, D., Pease, C., Panico, M., Dell, A., Morris, H., Lepoittevin, J.P. (2004) Effect of glutathione on the covalent binding of the ¹³C-labelled skin sensitizer 5-chloro-2-methylisothiazol-3-one to human serum albumin: Identification of adducts by nuclear magnetic resonance, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, and nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* **17**: 1280–1288.
- [186] Aleksic, M., Pease, C.K., Basketter, D.A., Panico, M., Morris, H.R., Dell, A. (2007) Investigating protein haptentation mechanisms of skin sensitizers using human serum albumin as a model protein. *Toxicology in Vitro* **21**: 723–733.
- [187] Aleksic, M., Pease, C.K., Basketter, D.A., Panico, M., Morris, H.R., Dell, A. (2008) Mass spectrometric identification of covalent adducts of the skin allergen 2,4-dinitro-1-chlorobenzene and model skin proteins. *Toxicol. In Vitro*. **22**: 1169–1176.
- [188] Gerberick, F., Aleksic, M., Basketter, D., Casati, S., Karlberg, A.T., Kern, P., Kimber, I., Lepoittevin, J.P., Natsch, A., Ovigne, J.M., al., e. (2008) Chemical reactivity measurement and the predictive identification of skin sensitizers. The report and recommendations of ECVAM Workshop 64. *Alternatives to Laboratory Animals* **36**: 215–242.
- [189] Aleksic, M., Thain, E., Roger, D., Saib, O., Davies, M., Li, J., Aptula, A., Zazzeroni, R. (2009) Reactivity Profiling: Covalent Modification of Single Nucleophile Peptides for Skin Sensitization Risk Assessment. *Toxicological sciences* **108**: 401-411.
- [190] Eilsteina, J., E.Giménez-Arnaua, Duchéb, D., Cavusoglub, N., G.Husslerb, Roussetb, F., Lepoittevin, J.-P. (2008) Sensitization to p-amino aromatic compounds: Study of the covalent binding of 2,5-dimethyl-p-benzoquinonedimine to a model peptide by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**: 5482-5489.
- [191] Jenkinson, C., Jenkins, R.E., Maggs, J.L., Kitteringham, N.R., Aleksic, M., Park, B.P., Naisbitt, D.J. (2009) A Mechanistic Investigation into the Irreversible Protein Binding and Antigenicity of p-Phenylenediamine. *Chemical Research in Toxicology* **22**: 1172-1180.
- [192] Mutschlera, J., Giménez-Arnaua, E., Foertschb, L., Gerberick, G.F., Lepoittevin, J.-P. (2009) Mechanistic assessment of peptide reactivity assay to predict skin allergens with Kathon® CG isothiazolinones. *Toxicology in vitro* **23**: 439-446.
- [193] Redeby, T., Nilsson, U., Altamore, T.M., Ilag, L., Ambrosi, A., Broo, K., A.Börje, Karlberg, A.-T. (2010) Specific Adducts Formed through a Radical Reaction between Peptides and Contact Allergenic Hydroperoxides. *Chemical Research in Toxicology* **23**: 203-210.
- [194] Troutman, J.A., Foertsch, L.M., Kern, P.S., Dai, H.J., Quijano, M., Dobson, R.L.M., Lalko, J.F., Lepoittevin, J.P., Gerberick, G.F. (2011) The Incorporation of Lysine into the Peroxidase Peptide Reactivity Assay for Skin Sensitization Assessments. *Toxicological sciences* **122**: 422-436.
- [195] Dietz, L., Esser, P.R., Schmucker, S.S., Goette, I., Richter, A., Schnölzer, M., Martin, S.F., Thierse, H.-J. (2010) Tracking Human Contact Allergens: From Mass Spectrometric Identification of Peptide-Bound Reactive Small Chemicals to Chemical-Specific Naive Human T-Cell Priming. *Toxicological sciences* **117**: 336-347.
- [196] Thethi, A.K., Dellen, R.G.V. (2004) Dilemmas and controversies in penicillin allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America* **24**: 445-461.
- [197] Aboderin, A.A., Semakula, R.E.K., Boedefeld, E., Kenner, R.A. (1973) Base-promoted cleavage of a-N-NBD-peptides. *Febs letters* **34**: 90-94.
- [198] Canavera, E., Gennaro, P.D., Farina, F., Orlandi, M., Rindone, B. (1993) Synthesis and characterization of Penicillin-Poly (L-Lysine) which recognizes human IgE anti-penicillin antibodies. *Bioconjugate chemistry* **4**: 309-313.
- [199] Vermuri, P., Harris, K.E., Suh, L.A., Grammer, L.C. (2004) Preparation of benzylpenicilloyl-polylysine: A preliminary Study. *Allergy and Asthma Proceedings* **25**: 165-168.

- [200] Marco, M.-P., Gee, S., Hammock, B.D. (1995) Immunochemical techniques for environmental analysis I. Antibody production and immunoassay development. *Trends in Analytical Chemistry* **14**: 415-425.
- [201] Estévez, M.C., Galve, R., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.-P. (2008) Disulfide Symmetric Dimers as Stable Pre-Hapten Forms for Bioconjugation: A Strategy to Prepare Immunoreagents for the Detection of Sulfofenyl Carboxylate Residues in Environmental Samples. *Chemistry European Journal* **14**: 1906-1917.
- [202] Bernatowicz, M.S., Matsueda, G.R. (1986) Preparation of peptide-protein immunogens using N-succinimidyl bromoacetate as a heterobifunctional crosslinking reagent. *Analytical Biochemistry* **155**: 95-102.
- [203] Nielsen, O., Buchardt, O. (1991) Facile synthesis of reagents containing a terminal maleimido ligand linked to an active ester. *Synthesis* **10**: 819-821.
- [204] Yallow, R.S., Berson, S.A. (1959) Immunogenic specificity of peptide hormones. *Nature* **184**: 1648.
- [205] Yallow, R.S., Berson, S.A. (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Journal of Clinical Investigation* **39**: 1157-1175.
- [206] Ibraimi, F., Kris, D., Lu, M., Hansson, L.-O., Kriz, K. (2006) Rapid one-step whole blood C-reactive protein magnetic permeability immunassay with monoclonal antibody conjugated nanoparticles as superparamagnetic labels and enhanced sedimentation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **384**.
- [207] Kohler, G., Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.
- [208] Johansson, S.G.O. (2011) The History of IgE: From Discovery to 2010. *Current Allergy and Asthma Reports* **11**: 173-177.
- [209] Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470.
- [210] Hiller, R., Laffer, S., Harwanegg, C., Huber, M., al., e. (2002) Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *The FASEB Journal* **16**: 414-416.
- [211] Bacarese-Hamilton, T., Mezzasoma, L., Ingham, C., Ardizzoni, A., Rossi, R., Bistoni, F., Crisanti, A. (2002) Detection of allergen-specific IgE on microarrays by use of signal amplification techniques. *Clinical Chemistry* **48**: 1367-1370.
- [212] Lebrun, S.J., Petchpud, W.N., Hui, A., McLaughlin, C.S. (2005) Development of a sensitive, colorimetric microarray assay for allergen-responsive human IgE. *Journal of Immunological Methods* **300**: 24-31.
- [213] González-Buitrago, J.M., Ferreira, L., Isidoro-García, M., Sanz, C., Lorente, F., Dávila, I. (2007) Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases *Clinica Chimica Acta* **385**: 21-27.
- [214] Wöhrl, S., Vigl, K., Zehetmayer, S., Hiller, R., Jarish, R., Prinz, M., Stingl, G., Kopp, T. (2006) The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy* **61**: 633-639.
- [215] Ludwig, F.R., Jay, F.A. (1985) Reversible chemical cross-linking of the light-harvesting polypeptides of *Rhodospseudomonas viridis*. *European Journal of Biochemistry* **151**: 83-87.