

DESARROLLO DE NANOANTICUERPOS

Llamas contra el rotavirus humano

Investigadores argentinos descubrieron una novedosa manera de combatir esta enfermedad diarreica que afecta principalmente a niños menores de cinco años. La presencia de anticuerpos VHH en leche de vaca se presenta como una alternativa 100 por ciento efectiva y de bajo costo.

Por Felicitas Terreno



RV Y SUS TRES CAPAS

Los rotavirus del grupo A, son virus no envueltos que están compuestos por tres capas concéntricas de proteínas que engloban al genoma viral. La capa interna es la Proteína Viral (Viral Protein en inglés -VP-) 2, la intermedia es la VP6, y la más externa es la VP7. No obstante, también cuenta con unas especies de puntas que sobresalen que son las VP4 y unos pequeños agujeros llamados “canales”.

El desarrollo de anticuerpos suele basarse en las proteínas externas pero éstas suelen variar mucho. Por ejemplo, el rotavirus posee 35 variantes de VP4 y más de 20 de VP7. No obstante, la VP6 prácticamente no cambia entre todas las clases de rotavirus del grupo A, a la vez que representa el 51 por ciento de la masa viral.

Por ello es que la mayoría de las estrategias de identificación y lucha contra el RV se basan en atacar a la VP6, aunque los resultados no fueron buenos hasta que los investigadores del INTA desarrollaron los nanoanticuerpos de llama anti VP6 (VHH). Según estiman, debido a que su tamaño es muy pequeño, los VHH estarían ingresando al virus por los “canales” hasta llegar al VP6 para neutralizarlo.

“Tengo una vaca lechera, no es una vaca cualquiera...” afirmaba una canción infantil. Sólo que hay una diferencia: esta vaca no va a dar leche merengada, sino que producirá una **leche especial** con un componente que permite combatir la diarrea por rotavirus en niños.

Se trata de los VHH, unas moléculas derivadas de los anticuerpos de los camélidos, que son “**las más pequeñas que existen en la naturaleza** capaces de reconocer a otra y de neutralizarla”, asegura a la Revista RIA la responsable del Laboratorio de Virus Diarreicos del INTA Castelar, Viviana Parreño.

Las enfermedades diarreicas son la **segunda causa de muerte** de niños menores de cinco años en el mundo. Si bien suelen ser “prevenibles y tratables”, lo cierto es que fallecen cerca de **un millón y medio** de niños cada año, según afirma la Organización Mundial de la Salud. Las dos causas más comunes de enfermedades diarreicas en países en desarrollo son los Rotavirus (RV) y la *Escherichia coli*.

En la Argentina, el Programa de Vigilancia del Ministerio de Salud informó que el **42 por ciento de las internacio-**

nes por diarrea en niños menores de tres años se deben al RV, enfermedad que llega a ocasionar deshidratación en el 83 por ciento de los infectados.

En el mercado actualmente existen dos vacunas disponibles compuestas por el **virus vivo atenuado** que son altamente eficaces para la reducción de la diarrea y de la mortalidad. No obstante, la seguridad y eficacia de su administración en pacientes inmunocomprometidos **no está comprobada**, según advierte el Ministerio de Salud de la Nación.

VHH vs Rotavirus

La investigadora que forma parte del equipo de Parreño, Lorena Garaicochea, desarrolló estos nanoanticuerpos VHH durante su tesis doctoral en colaboración con científicos alemanes del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL, por sus siglas en inglés). Los resultados del trabajo indicaron que los **VHH pueden neutralizar a la infección por una amplia variedad de variantes (serotipos) de Rotavirus grupo A**. Según explica, “estos nanoanticuerpos se unen a la proteína VP6 de Rotavirus, una proteína interna

del virus que conforma más del 50 por ciento de su masa”.

Mientras los estudios realizados hasta este momento se centraban en “atacar” la parte externa del virus, los investigadores del INTA pudieron comprobar que, de alguna manera, estos anticuerpos atacaban “su corazón” (ver recuadro: **RV y sus tres capas**).

La capa superficial del virus, contra la cual se suelen generar las vacunas, cambia constantemente año a año y de especie a especie, tal como el virus de la influenza. Por ejemplo, las cepas de **rotavirus grupo A** detectadas hasta el momento poseen 35 variantes de las

“SI EXISTIERA UNA LECHE QUE PROTEGIERA CONTRA EL ROTAVIRUS, OCASIONARÍA UN IMPACTO SANITARIO REALMENTE IMPORTANTE” (ANDRÉS BERCOVICH).

**LOS VHH SON LAS MOLÉCULAS
MÁS PEQUEÑAS QUE EXISTEN
EN LA NATURALEZA CAPAZ
DE RECONOCER A OTRA
Y DE NEUTRALIZARLA.**

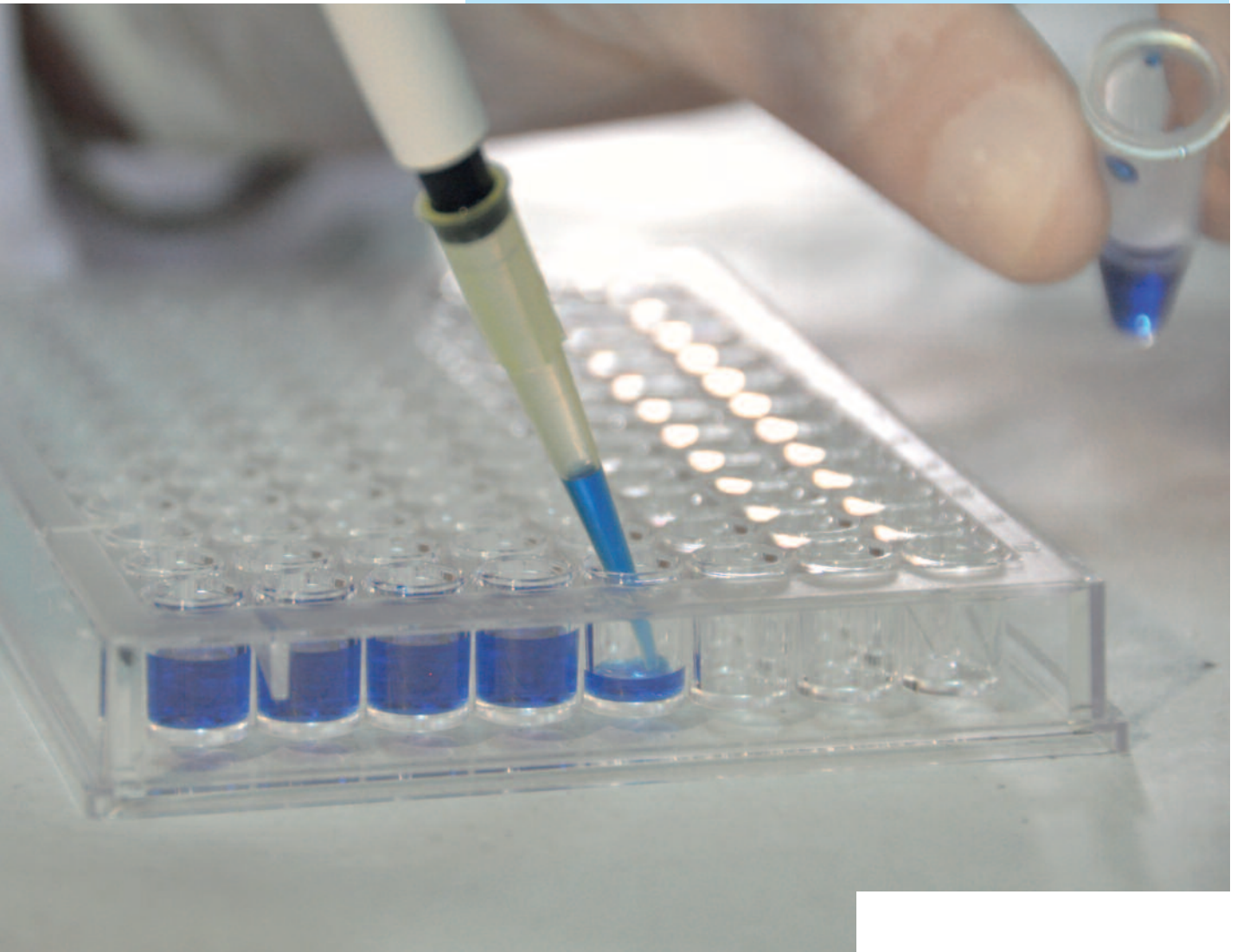
proyecciones que sobresalen en su capa externa, **y más de 20** de la superficie de esa capa, por lo que para lograr vacunas efectivas se desarrollan formulaciones multivalentes que inducen anticuerpos contra los serotipos más comunes que afectan a humanos. Estas vacunas recombinantes y atenuadas son muy costosas y no incluyen los serotipos raros que circulan en algunos países de Sudamérica, África y Asia.

Al atacar la parte interna del virus, tal como lograron los investigadores, **tanto animales como humanos quedan protegidos** contra la diarrea causada por los RV del grupo A.

“Aún no sabemos cómo funciona ese mecanismo pero especulamos que por los orificios que hay disponibles en el virus el anticuerpo se mete y se engancha a la VP6. **Entonces no importa qué diferencia haya en la superficie**”, sostienen Garaicoechea y Parreño.

Pero su pequeñez y capacidad de escabullirse no es la única característica extraordinaria de los VHH: en general, cuando las moléculas son expuestas a altas temperaturas o a cambios en el pH, suelen desnaturalizarse (o cambiar su estructura). Pero los VHH no: estas moléculas pueden ingresar en un **ambiente muy ácido** (como el del estómago) y cuando llegan al intestino, que posee un pH levemente alcalino, se arman nuevamente y mantienen sus propiedades funcionales. Y como si eso fuera poco, también resisten **altas temperaturas** como las utilizadas durante la pasteurización.

“Esto quiere decir que si logramos desarrollar una vaca transgénica que en su leche exprese estos nanoanticuerpos, podríamos pasteurizar esa leche y dársela a un bebé para protegerlo, por ejemplo, contra la diarrea por Rotavirus”, adelantan las investigado-



VHH: Plataforma hacia el futuro*

Los nanoanticuerpos **VHH** representan una herramienta muy ventajosa y con **características únicas y diferentes al del resto las Igs** que los hacen muy atractivos para distintas aplicaciones biotecnológicas. Una característica diferencial muy importante es su **capacidad de permanecer estables y resistir a cambios de temperatura y de ambientes químicos**. Esto abre un sinfín de aplicaciones que pueden abarcar desde la administración en forma de tópico u oral (dado que resiste al pH drástico del estómago) a la pasteurización (ya que tolera altas temperaturas). Al ser administrados oralmente, poseen la ventaja de ser muy poco inmunogénicos, lo que se convierte en una diferencia muy importante respecto de los anticuerpos convencionales. A su vez, se pueden modificar por ingeniería genética para evitar su rechazo (humanización) y, así, lograr su administración sistémica.

El crecimiento exponencial de aplicaciones de los VHH también se debe a que estos anticuerpos de dominio único son más **económicos, simples y fáciles de producir**. Además, sólo poseen 1/10 del tamaño de un anticuerpo completo. De esta manera, estas moléculas combinan las características únicas de un anticuerpo con las ventajas de las drogas de pequeño tamaño que pueden **penetrar tejidos y tumores más rápido que los anticuerpos convencionales**.

Se estima que los nanoanticuerpos son capaces de saturar un tumor a una velocidad **10 veces mayor** que una IgG convencional. También se ha demostrado que pueden atravesar la barrera hematoencefálica, lo que los convierte en excelentes candidatos para ser utilizados en terapia medicinal de enfermedades del sistema nervioso central. Su pequeño tamaño también otorga la oportunidad única de ser **multimerizados**, lo que en ciertos casos aumenta significativamente su actividad biológica y, más aún, les otorga especificidades nunca antes vistas.

Finalmente, pueden ser fusionados a drogas (se los utiliza en el direccionamiento de terapia génica y el delivery de drogas oncológicas). También se utilizan en la industria cosmética y en la neutralización de toxinas y venenos de escorpiones y ofidios.

Hasta el momento existen **ocho nanoanticuerpos en ensayos clínicos** que abarcan el tratamiento de enfermedades autoinmunes, cáncer, alteraciones hematológicas y tratamiento de la infección por virus respiratorio sincicial, entre otros.

Por Viviana Parreño,

Responsable del Laboratorio de Virus Diarreico, INTA Castelar.



ras que luego del hallazgo se sumaron a la plataforma técnico-organizativa para el desarrollo de proyectos tecnológicos del INTA (INCUINTA) liderada por Andrés Wigdorovitz.

El comienzo de algo histórico

Así, dado el elevado potencial de estas pequeñas moléculas, el INTA comenzó a trabajar con BioSidus (una empresa argentina que produce biofármacos y que tiene vasta experiencia en transgénicos) para desarrollar una vaca que exprese los nanoanticuerpos VHH en su leche. Para llevar a cabo este proyecto se constituyó un consorcio en el que participan otras dos empresas del sector lácteo (Establecimiento Lácteo San Marcos y Aproagro SA).

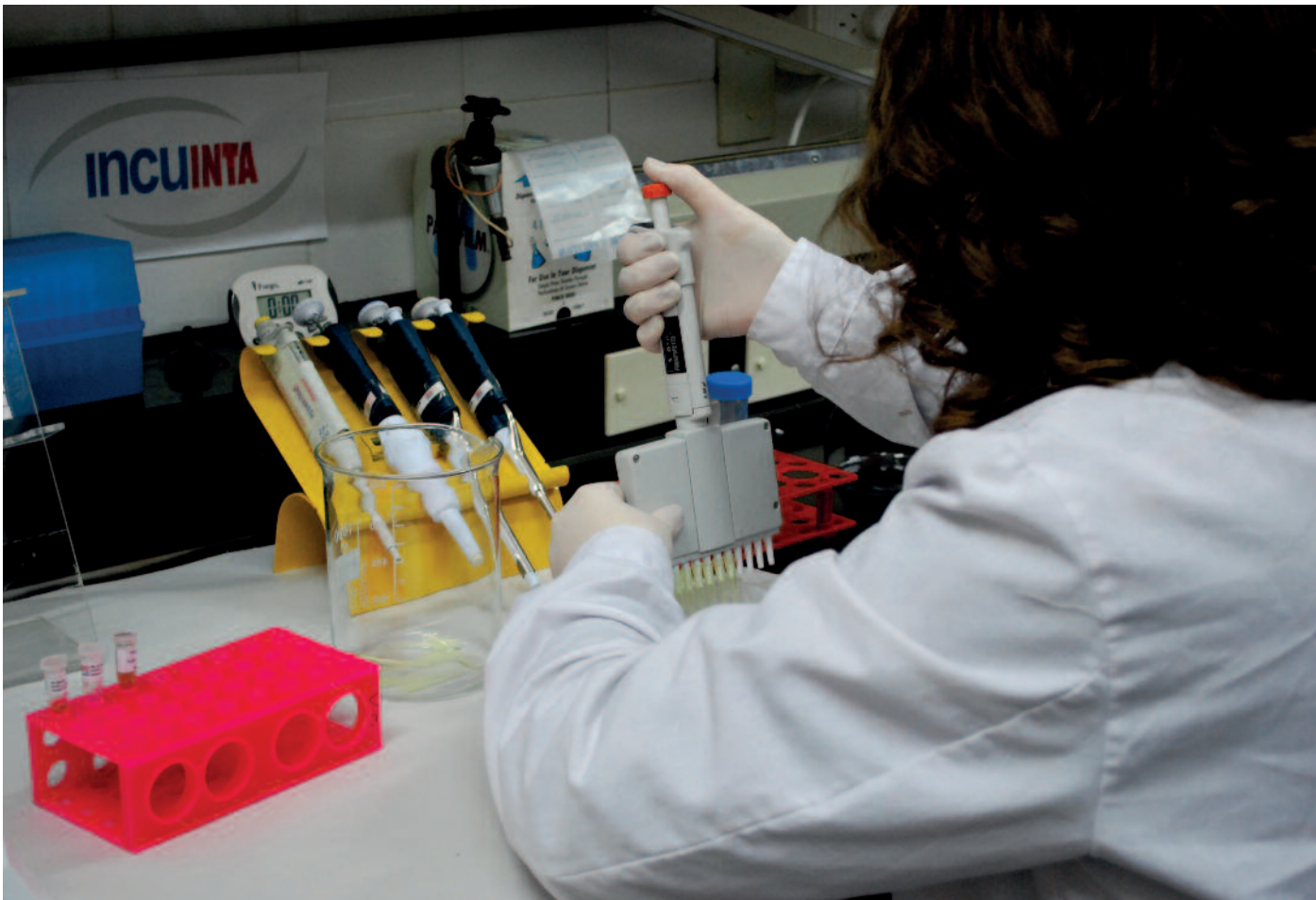
El proyecto se presentó a la convocatoria de Alimentos Funcionales del Fondo Argentino Sectorial (FONAR-SEC) y obtuvo financiación para desarrollar alimentos lácteos funcionales que contengan VHH anti rotavirus en su formulación y, de esa manera, reduzcan el impacto de las diarreas por rotavirus en niños.

En este sentido, según comentó a la Revista RIA el responsable del departamento de Investigación y Desarrollo de la empresa Biosidus, Andrés Bercovich, "si existiera una leche que tuviera una característica nutricional que protegiera contra el rotavirus, podría ocasionar un **impacto sanitario realmente importante**".

Para lograr este alimento, la empresa solicitó a la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) una autorización y, si bien Bercovich entiende que este proyecto tiene un **largo camino por recorrer** (que esperan finalizar hacia 2018), los investigadores de BioSidus ya comenzaron a hacer un trabajo de ingeniería genética en el laboratorio que conlleva una serie de exámenes de concepto para comprobar si se puede producir la leche con esos VHH.

A su vez, desde el INTA se realizaron pruebas en animales que confirmaron la actuación de los anticuerpos VHH contra la diarrea por RV.

En este sentido, Celina Vega y Marina Bok, integrantes del equipo de Parreño en Castelar, demostraron que la administración de leche suplementada



**Los VHH,
AL SER ALTAMENTE
ESPECÍFICOS
Y RACIONALMENTE
DISEÑADOS, SE PROYECTAN
COMO UNA SOLUCIÓN PARA
EL CONTROL DE LAS
DIARRIAS NEONATALES.**

con los VHH desarrollados previno la diarrea en lechones mantenidos bajo condiciones de esterilidad.

Según afirman, “este resultado que logramos con colaboradores norteamericanos, fue muy alentador y representa una prueba de que estas moléculas tiene un elevado potencial de convertirse en un tratamiento preventivo o terapéutico de las diarrea por este agente viral”.

Las crías de cerdo no sólo son susceptibles de contraer rotavirus humano, sino que son **similares a los bebés** en lo que respecta a peso, fisiología del intestino, dieta láctea y desarrollo de la respuesta inmune.

Así, el tratamiento preventivo con esta leche indujo **un 100 por ciento de protección** frente a la diarrea causada por la infección experimental con Rotavirus humano. Además, **no interfirió con el desarrollo de la respuesta in-**



mune específica contra ese virus, por lo que no sólo protegió al cerdo frente a la diarrea, sino que no impidió que el organismo genere anticuerpos propios contra el virus. Así, generó una “memoria inmunológica” en el caso de futuras exposiciones ante el RV.

Según los resultados del trabajo, “estos VHH resultan una estrategia de inmunidad pasiva novedosa que podrían, incluso, ser aplicados en **niños prematuros o inmunocomprometidos**, complementándose con la vacuna. Debido a que son altamente específicos y racionalmente diseñados, se proyectan como una **solución versátil y económica** para el control de las diarreas neonatales”.

Para Bercovich, las vacunas que existen actualmente contra el rotavirus “son bastante caras y a los gobiernos se suele dificultar realizar campañas

de vacunación así que nosotros queremos que este desarrollo pueda ser utilizado en esas campañas y que llegue a la gente de bajos recursos que, justamente, son quienes tienen más alta prevalencia de diarrea por este virus”.

Aún así, el director de I+D de Biosidus advierte que “el desarrollo de alimentos funcionales como este busca dar una cierta protección contra la enfermedad, lo que **no necesariamente significa que vaya a curar la infección o a reemplazar una vacuna**”.

Una vez lograda la aprobación para comenzar a trabajar en el desarrollo de una vaca transgénica, habrá que seguir una serie de pasos para comprobar que la leche podrá ser consumida por los infantes. Entre la serie de exámenes se encuentran los de **seguridad y eficacia** tanto en animales como en humanos.

**“SI LOGRAMOS DESARROLLAR
UNA VACA TRANSGÉNICA
QUE EN SU LECHE EXPRESE
ESTOS NANOANTICUERPOS,
VAMOS A PODER
PASTEURIZARLA Y DÁRSELA
A UN BEBÉ”
(VIVIANA PARREÑO).**

Evolución del desarrollo de VHH anti VP6 de Rotavirus

ACTIVIDADES - RESULTADOS

2006

Desarrollo
De biblioteca
VHH anti-VP6
de RVA

Personal INTA
en EMBL

2006-2008

Caracterización in vitro
Capacidad neutralizante
de amplio espectro

Estudios iniciales
de estabilidad

Protección ratón lactante

**Garaicoechea, Olichon y col,
JV 82 (19) 9753-68, 2008
Premio IX Congreso
Argentino de Virología, 2008*

SISTEMAS DE EXPRESIÓN

Expresión periplasma
*E. coli**

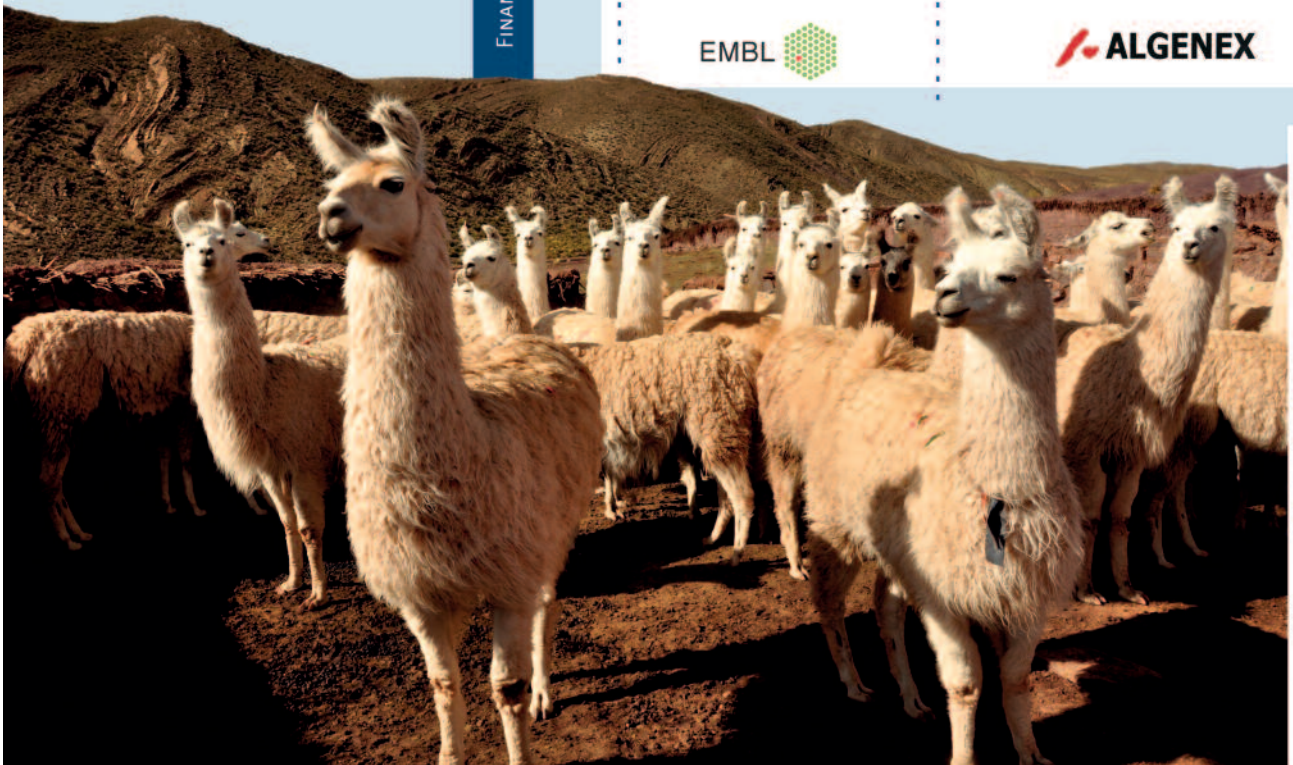


Convenio Cooperación Bilateral
SecyT-BMBF 30,000€



Solicitud PATENTE INTA-Algenex
100,000 €

FINANCIACIÓN



2009-2010

Comparación de los VHH obtenidos en *E. coli* vs larva de insecto
Evaluación de protección en modelo ratón lactante

*Gómez Sebastián y col. enviado BMC Biotechnology, 2012

Evaluación de eficacia en **cerdos gnotobióticos** desafiados con rotavirus humano G1P[8]
Vega, Bok y col, 2011, Premio X Congreso Argentivo de virología, 2011.

Expresión larvas de insecto infectadas con baculovirus (Algenex)*



Subsidio R03 Fogarty Foundation
INTA-Algenex-FAHRP 25,000 €

2011

Estudios iniciales de mecanismo de neutralización viral
Capacitación L. Garaicoechea en lab Dr. Prasad, Baylor College, Houston Texas, USA

*Lenzt y col, Planta, 2012

PREMIO INNOVAR 2011 a la plataforma

Expresión en transplátomicas de Tabaco (INGEBI)*

Expresión en levaduras (Biomany SRL)



PICT Jóvenes 2010 8,000 €
Proyecto Específico Incuinta res. 790/09 20,000 €

2012

Inicio de desarrollo de vaca transgénica

Expresión en leche de Bovino Transgénico



HITOS

Subsidio FONARSEC
INTA-BIO AF 2,100,000 €



A su vez, también habría que considerar el desarrollo de un rodeo transgénico de unas 200 vacas para que su leche, con gran contenido de anticuerpos, pueda ser diluida con otra común y, así, cubrir las necesidades del mercado. Esto abaratará costos y dará la posibilidad de procesar esa leche como cualquier otra ya que los VHH resisten la pasteurización.

Bercovich asegura que se trata de la primera vez que se desarrolla un sistema así, por lo que “podría constituir una ‘plataforma’ de producción de estos nanoanticuerpos, versátil y muy económica. Decimos ‘plataforma’ porque en el caso de que funcione bien contra este virus uno podría hacer una leche que prevenga contra otros agentes patógenos” (ver columna “**VHH: Plataformas hacia el futuro**”).

De hecho, la novedad del desarrollo también encontró algunos escépticos entre la comunidad científica. Según comenta Parreño, “nadie nos creía que el anticuerpo contra esa proteína fuera neutralizante. Para publicar el trabajo nos pidieron hacer ocho experimentos más”, confiesa, “pero nos vino bien porque con cada uno de ellos confirmábamos aún más **que lo que lo-gramos era una realidad**”.

Más información:

Viviana Parreño –
vparreno@cniia.inta.gov.ar
La Dra. Parreño es Bioquímica por la Universidad de Morón y Doctora por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Es responsable del Laboratorio de Virus Diarreicos y coordinadora técnica del área de Investigación y Desarrollo de INCUINTA.