

NANOANTICUERPOS DERIVADOS DE LLAMAS: UNA ALTERNATIVA INNOVADORA PARA CONTROLAR LAS DIARREAS POR ROTAVIRUS Y NOROVIRUS HUMANO

Llama-derived nanobodies: an innovative approach to control human rotavirus and norovirus diarrhea

Gladys V. Parreno^{1,2}, Cecilia G. Vega^{1,2}, Marina Bok¹, Matías Adúriz^{1,2}, Lucía Maffey^{1,2}, Andrea Aguilar¹, Lorena Garaicoechea¹, Andrés Wigdorovitz^{1,2}

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Castelar.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

RESUMEN

Las diarreas agudas son una de las afecciones más comunes en personas de todas las edades, especialmente en niños menores de 5 años. Rotavirus (RV) es la principal causa de diarrea en niños a nivel mundial seguido por norovirus (NoV). Sin embargo, a partir de la implementación de la vacunación con RV, NoV pasó a tener un rol preponderante en varios países como EEUU y Nicaragua. En Argentina, luego del inicio de la vacunación obligatoria de RV se logró un alto porcentaje de cobertura vacunal y se evidenció un descenso del 10% en la ocurrencia de diarreas agudas en general y un descenso del 50% de las diarreas causadas específicamente por RV, demostrando el éxito rotundo de la intervención. No existen al momento vacunas contra NoV, lo que lleva al desarrollo de otras estrategias de contención. A través del laboratorio INCUINTA del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), se han desarrollado y patentado nanoanticuerpos VHH contra RV y NoV con propiedades que los transforman en excelentes herramientas para el desarrollo de métodos de diagnóstico y para su utilización en estrategias de inmunidad pasiva oral para el tratamiento y prevención de la infección causada por estos agentes virales. Los nanoanticuerpos anti RV fueron utilizados con éxito para el desarrollo de un kit de ELISA nacional validado junto con el Instituto Malbrán que está siendo registrado para su comercialización. Además, demostraron poseer capacidad neutralizante de la infección contra RV *in vitro* y protección frente a la diarrea y excreción viral en los modelos de ratones lactantes y cerdos gnotobióticos. Los nano anticuerpos contra NoV poseen alta afinidad para la detección del virus y fueron capaces de bloquear la unión del virus a los receptores celulares *in vitro*, demostrando su potencial como moléculas terapéuticas y de diagnóstico. El objetivo final de este desarrollo es completar la triada diagnóstico-prevención-tratamiento para el control de las gastroenteritis virales con una tecnología de vanguardia de industria nacional.

Palabras claves: rotavirus, norovirus, diarrea, nanoanticuerpos, VHH, INCUINTA.

ABSTRACT

Acute diarrhea is a common affection in people of all ages, especially in children under five years old. Rotavirus (RV) is the major cause of diarrhea in children worldwide followed by norovirus (NoV). However, after the introduction of RV vaccine in the vaccination calendar in several countries like the USA and Nicaragua, NoV is having an important role in gastroenteritis incidence. In Argentina, after the introduction of the RV vaccine, high vaccine coverage was reached and the overall acute diarrhea incidence was reduced in a 10% and RV-associated diarrhea was reduced 50%, leading to complete success of the vaccination strategy. At the moment, there are no vaccines against NoV, thus, it is a need to develop therapies to control this disease. INCUINTA has developed and patented two sets of VHH nanobodies against RV and NoV with unique properties that make them suitable for the development of diagnostic tools, as well as to design oral passive immune strategies to prevent and treat these two viral infections associated with diarrhea. VHH against rotavirus were able to neutralize RV infection in a suckling mouse model and in a gnotobiotic pig model of human RV infection and disease. Also, they were used to develop an ELISA kit for RV detection in human and animal samples. The ELISA kit was statistically validated in collaboration with the Malbrán Institute and is being registered for commercialization. VHH to NoVs showed high affinity to the virus and blocked the interaction between the virus and histo-blood antigens in target cells *in vitro*, showing to be a potential tool to detect and treat NoV infection. The final goal of this project is to complete the diagnostic-prevention-treatment triad to control viral gastroenteritis using a vanguard technology made in Argentina.

Keywords: Rotavirus, Norovirus, diarrhea, nanobody, VHH, INCUINTA.

Impacto de la diarrea aguda en Salud Pública

Las diarreas agudas son una de las afecciones más comunes en personas de todas las edades, con complicaciones potencialmente graves en niños y en adultos mayores, quienes son más vulnerables a la deshidratación. En particular, la diarrea aguda es una de las entidades clínicas más comunes de la primera infancia. Globalmente, se producen cerca de 1.7 billones de casos de diarrea en niños por año. Específicamente las diarreas infecciosas representan la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años. En 2016, ocasionaron el 11% de las muertes (1 de cada 9 muertes) registradas en niños menores de 5 años a nivel mundial. Este dato se traduce en la muerte de 1.300 niños por día y 480.000 muertes anuales. Es importante destacar que en niños con HIV la tasa de muerte por diarrea sube 11 veces. La diarrea aguda mata más niños que la malaria, el sarampión y el SIDA combinados (Figura 1).

Causes of Child Deaths Worldwide

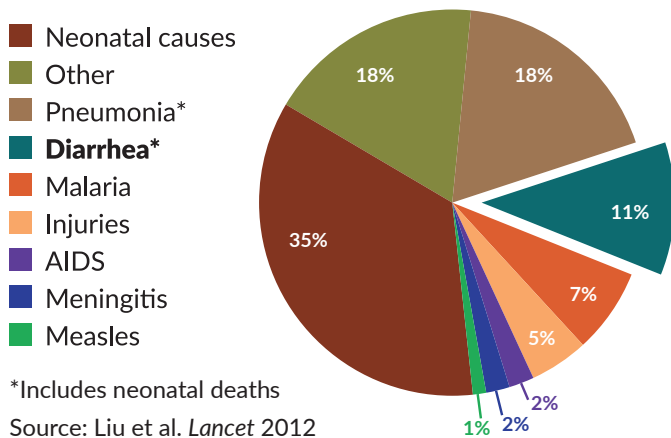


Figura 1: Causas de muerte en niños en el mundo.

Tal es el impacto de esta enfermedad en la infancia que en el año 2016 la OMS y Unicef definieron un plan mundial con el objetivo poner fin a las muertes asociadas a neumonía y diarrea para el año 2025^[1].

Diarrea por rotavirus: un grave problema de la infancia

Rotavirus (RV) es el principal agente productor de diarrea aguda infantil a nivel mundial^[2,3]. La gastroenteritis por RV se caracteriza por una diarrea acuosa profusa que dura entre 2 y 7 días y que, en algunos casos, llega a la deshidratación grave y muerte del paciente^[4]. A nivel global, RV es responsable del 25-50% de gastroenteritis infantiles que requieren hospitalización en países desarrollados y en vías de desarrollo, respectivamente. Este agente fue asociado a 24 millones de consultas ambulatorias, 2.4 millones de hospitalizaciones y 500.000 muertes por año de niños menores de 5 años. La vacuna comenzó a utilizarse en diferentes países en 2006 y, 7 años después, la tasa de muertes se redujo a 215.000 (197.000 - 233.000) en 2013.

En Argentina, en el periodo previo a la introducción de la vacuna de RV en el Calendario Nacional (2005-2013), se notificaron alrededor de 1.200.000 casos de diarreas agudas por año, de los cuales el 45-50% ocurrieron en niños menores de 5 años, lo que equivale a 490.000 a 550.000 casos de diarreas anuales y a tasas entre 1.450-1.650/10.000 niños menores de 5 años por año. Datos del año 2013 en esta población indicaron que el 26% de las diarreas en pacientes ambulatorios y el 30% en internados son causadas por agentes virales^[4]. En el año 2015, la vacuna monovalente contra RV fue incorporada al Calendario Nacional de Vacunación con un esquema de 2 dosis de 1,5 ml por vía oral a los 2 y 4 meses de vida^[5]. Dos años después del inicio de la estrategia de vacunación, se alcanzaron coberturas entre 61-75% y se evidenció un descenso global significativo de la ocurrencia de diarreas agudas del 10% (1.127,9 casos de diarrea aguda por cada 10.000 niños menores de 5 años, $p < 0,001$) y un descenso global del 50% de las diarreas causadas por RV, demostrando el éxito rotundo de la intervención. También se observó un desplazamiento de la estacionalidad en la ocurrencia de diarreas agudas de 10 semanas respecto a la etapa pre vacunación^[6].

A pesar del éxito global de la vacunación, al comparar su desempeño en las diferentes regiones de nuestro país, se evidenciaron reducciones significativas en las tasas promedio de diarrea aguda en menores de 5 años, 17,3% y 15,5% en el noreste y centro, respectivamente. En cambio, en la región noroeste solo se registró un descenso del 2,5% por lo que la diarrea aguda continúa siendo un problema importante para los niños de dicha región^[6]. En este sentido, sería importante contar con estrategias alternativas y complementarias a la vacunación, así como terapias específicas para tratar las diarreas por RV.

Otro punto importante a considerar son los costos asociados a esta enfermedad. Un estudio realizado en la provincia de Jujuy indicó que el costo por evento de diarrea aguda grave con hospitalización oscila entre \$3.298 y \$4.402, incluyendo gastos médicos directos e indirectos^[7].

Diarrea transmitida por alimentos e impacto de las infecciones por norovirus

Globalmente, se estima que los norovirus (NoV) son la causa más común de gastroenteritis aguda en humanos de todas las edades y responsables del 18% de las infecciones alimentarias. Aproximadamente 1 de cada 5 casos de gastroenteritis aguda (diarrea y vómitos) es causado por NoV. Este agente viral es responsable de 685 millones de casos anualmente, entre los cuales 200 millones ocurren en niños menores de 5 años de edad. Esto lleva a una cifra estimada de 50.000 muertes infantiles cada año. Aunque la mayoría de las muertes ocurren en países menos desarrollados, los NoV son un problema tanto en países de bajos ingresos como en los de altos ingresos. Se estima que cada año, los NoV generan gastos por 60.000 millones de dólares; estos costos son principalmente por atención médica (dinero gastado para tratar las complicaciones por los NoV).

y pérdida de productividad (personas que no pueden trabajar porque están enfermas). También se los ha considerado un tema de importancia para defensa, dado su potencial como arma biológica^[8].

Debido al amplio uso de la vacuna contra los RV, los NoV son ahora la causa más común de gastroenteritis aguda para la cual los niños necesitan atención médica en algunos países, entre los que se incluyen los Estados Unidos y Nicaragua. Es probable que esta tendencia continúe a medida que otros países vean los beneficios de la vacunación contra los RV. Respecto de NoV, no existe vacuna para prevenir la diarrea por este agente debido a que los mismos no crecen en sistemas de cultivo de tejidos. La cepa más común de NoV (genogrupo II genotipo 4, GII.4) es la causa principal de brotes en todo el mundo. El virus es altamente variable y surgen nuevas cepas cada 2 a 4 años que llevan a un aumento de brotes en el mundo. En Argentina se ha demostrado la circulación de los genogrupos GI y GII a partir de muestras clínicas de diferentes regiones del país.

Nanoanticuerpos o tecnología VHH

Los VHH o nanoanticuerpos son la nueva generación de anticuerpos monoclonales recombinantes, los cuales son derivados de los camélidos. Brevemente, los camélidos poseen un porcentaje de sus inmunoglobulinas IgG carentes de cadena liviana y también del dominio constante CH1, estas inmunoglobulinas se denominan anticuerpos de cadena pesada y su porción variable, la cual reconoce al antígeno, se denomina VHH^[9,10]. El advenimiento de la ingeniería genética hizo posible clonar la población de segmentos génicos VHH derivados de una llama inmunizada con un antígeno de interés dado y a partir de esta biblioteca de genes VHH, seleccionar aquellos clones con especificidad para el antígeno de interés y con ciertas características deseables (resistencia térmica, resistencia a pH ácidos, neutralización viral, etc.), representando anticuerpos monoclonales recombinantes^[9,10]. Los nanoanticuerpos poseen tamaño pequeño (15kDa), constituyendo las moléculas más pequeñas presentes en la naturaleza con capacidad de reconocer a un antígeno con elevada especificidad y afinidad (nanomolar). Dentro de sus propiedades diferenciales respecto a los anticuerpos convencionales se destaca su acceso a epitopes ocultos no disponibles para los anticuerpos comunes, su elevada penetración en tejidos tumorales (10 veces mayor que la de un anticuerpo monoclonal convencional), elevada estabilidad térmica que le permite no depender de cadenas de frío e incluso resistir tratamientos como la pasteurización, alta estabilidad física, resultando resistentes a los cambios extremos de pH (resisten el pH estomacal) y a la digestión enzimática (por enzimas gastrointestinales). Son moléculas muy versátiles que se expresan fácilmente en distintos sistemas de expresión como bacterias, levaduras, células de mamíferos e incluso se han producido en la leche de ratonas transgénicas^[11] y vacas transgénicas desarrollada por nuestro grupo conjuntamente con la empresa Biosidus^[12].

Tecnología VHH en Argentina

Desde el año 2005, el grupo de investigación de INCUINTA de INTA y CONICET, en colaboración con varios grupos de investigación internacionales, está trabajando en la plataforma de nanoanticuerpos. Actualmente, cuenta con un llamario (Figura 2) y produce nanoanticuerpos contra varios agentes virales de impacto en salud humana, animal y vegetal. Como se mencionó anteriormente para el caso de los virus entéricos, posee dos familias de nanoanticuerpos específicos contra RV y NoV que, por sus propiedades únicas y altura inventiva, fueron patentados por INTA en el caso de RV (WO2009016100) y en colaboración entre el INTA y el National Institutes of Health (NIH) de EE UU en el caso de NoV (US20180251527).



Figura 2: Llamario en INTA de Castelar.

En el caso de RV, los nanoanticuerpos seleccionados demostraron reconocer a todas las variantes de virus, animales y humanas. Esto permitió el diseño de un kit diagnóstico rápido de RV en formato de ELISA en microplaca. Este kit fue validado con paneles de muestras pediátricas de Argentina, demostrando óptimas sensibilidad y especificidad diagnósticas y está, actualmente, en proceso de registro para su comercialización. El impacto de este kit diagnóstico no sólo redundará en un mayor diagnóstico en los cuadros de diarreas en niños en Argentina, sino que además permitirá continuar con la estimación del impacto sanitario de RV a nivel epidemiológico. Por otro lado, estos nanoanticuerpos lograron proteger parcialmente a ratones lactantes y cerdos gnotobióticos frente a la diarrea causadas por RV en condiciones experimentales. Esto demuestra que los nanoanticuerpos desarrollados poseen la capacidad de interferir la infección por estos virus, evitando el cuadro de diarrea^[13].

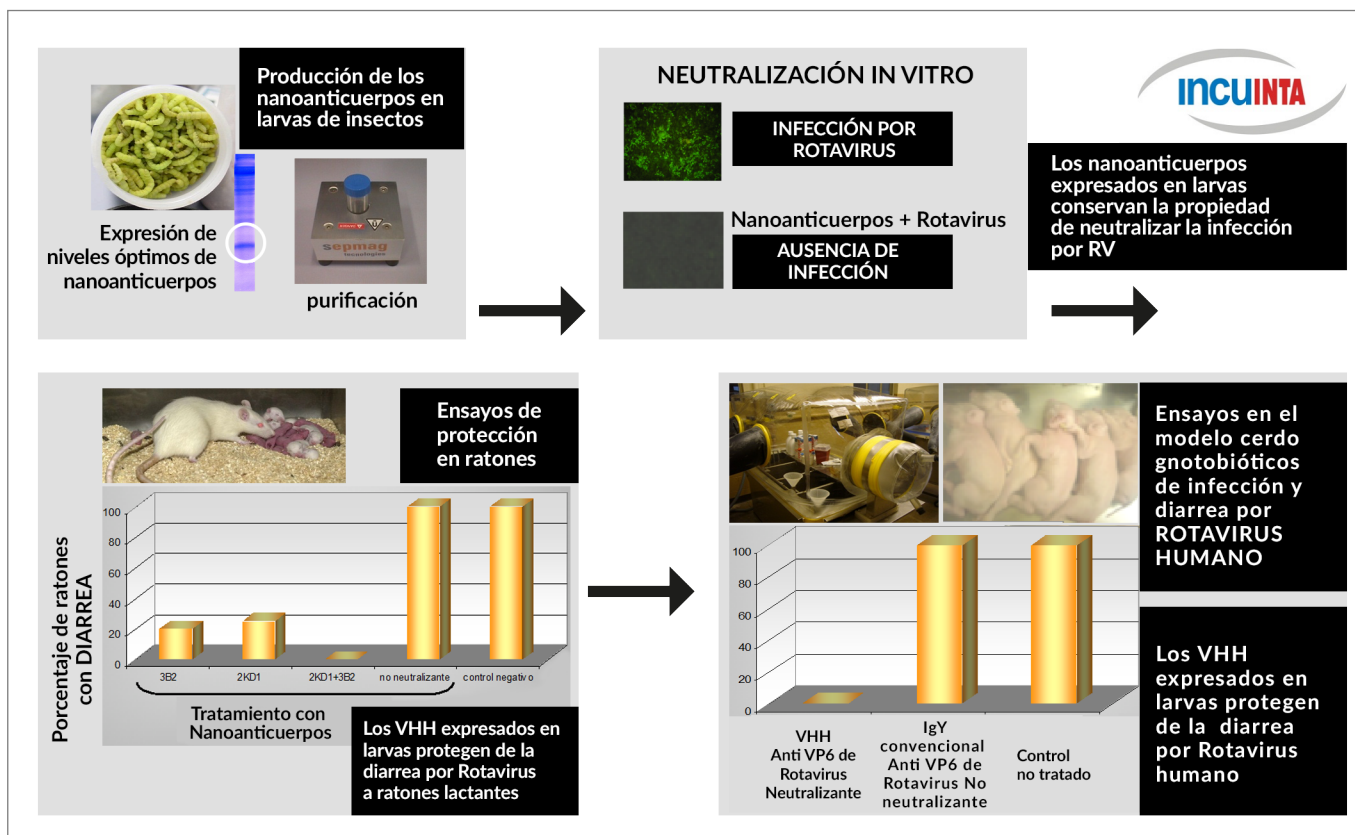


Figura 3: Los nanoanticuerpos anti RV 3B2 y 2KD1 presentaron actividad neutralizante in vitro, protegieron parcialmente a ratones lactantes de la diarrea y excreción viral luego del desafío con RVmurino de alta virulencia^[14], mientras que el clon 3B2 protegió de la diarrea al 100% de los lechones tratados con leche suplementada con este VHH y redujo en dos logaritmos la cantidad de virus excretado respecto del grupo control no tratado o del grupo tratado con anticuerpos IgY anti VP6 de RV^[13].

En el caso de los nanoanticuerpos seleccionados contra NoV, hemos demostrado que son capaces de reconocer al virus con alta afinidad en el contexto de un ELISA en microplaca, lo que los hacen herramientas excelentes para el desarrollo de un kit diagnóstico para el virus. Un ensayo de ELISA en etapa de desarrollo en INCUINTA que utiliza un nanoanticuerpo dímérico contra NoV GI como captura fue capaz de detectar con una sensibilidad diez veces mayor que el único ensayo comercial aprobado por el Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), Estados Unidos de América (USA, por sus siglas en inglés) para el diagnóstico de NoV. En este momento, se está trabajando en el desarrollo de nanoanticuerpos díméricos para las variantes GII y GIV y, así, poder detectar todas las variantes de NoV que infectan a los humanos. Por otro lado, algunos clones de nanoanticuerpos anti NoV fueron capaces de bloquear la unión de partículas virales vacías (VLPs) a los antígenos histo sanguíneos del sistema HBGA presentes en las células blanco a los cuales se une el virus en su mecanismo natural de infección, indicando que estas moléculas podrían tener un alto potencial neutralizante de la infección por NoV *in vivo*^[15].

A partir de estos nanoanticuerpos puede proponerse un círculo virtuoso que permita detectar, prevenir y curar las diarreas por RV y NoV; ya que se podrían utilizar estas moléculas para reducir el riesgo de contraer la infección y diarrea por ambos agentes mediante el desarrollo y distribución en la población de alimentos funcionales (leche y sus derivados suplementados con VHHs). En casos de diarreas, se podría contar con métodos diagnósticos económicos y versátiles para detectar ambos agentes virales y sumar a la terapia de soporte que se usa habitualmente (sales de rehidratación oral) en los cuadros de diarrea la administración de un biofármaco que contenga los nanoanticuerpos para RV y NoV. Este tratamiento antiviral específico resultaría muy útil en los pacientes en estado de deshidratación y peligro de muerte así como en los pacientes inmunosuprimidos con infecciones virales crónicas. Finalmente, se podría desarrollar un producto conteniendo nanoanticuerpos contra RV y NoV para administrar preventivamente a poblaciones de riesgo.

CONCLUSIONES

Tal lo mencionado previamente, a nivel mundial, RV y NoV son los principales agentes infecciosos asociados a diarreas en niños y adultos. Luego de varios años de aplicación masiva de la vacuna de RV (2006 en adelante), NoV ha tomado un lugar protagónico en la población infantil con el agravante de que no existen vacunas para combatirlo y de que es un agente que afecta a personas de todas las edades. Esta coyuntura posiciona a los nanoanticuerpos desarrollados contra RV y NoV como una estrategia excelente para desarrollar un biofármaco para prevenir o tratar las diarreas virales en humanos, complementando a la vacuna de RV y dando una alternativa a la ausencia de vacunas para NoV.

Estos nanoanticuerpos buscan resolver tres problemas críticos del abordaje de las diarreas: la falta de métodos de diagnóstico *bed-side o point of care* para detectar RV y NoV, la ausencia de una línea de alimentos funcionales económicos que lleguen a todos los estratos sociales, especialmente a las poblaciones de riesgo, que reduzcan el riesgo de diarreas en la población en general como una medida más de salud pública, y la carencia de tratamientos específicos para estas dos infecciones virales de alto impacto.

Este tipo de estrategias de inmunidad pasiva oral basadas en nanoanticuerpos monoclonales recombinantes es fundamental para desarrollar leches maternizadas suplementadas con VHH que reduzcan la carga viral en las poblaciones susceptibles (lactantes, niños-especialmente con desnutrición-, pacientes inmunosuprimidos, transplantados, etc.). Los VHH son la nueva generación de anticuerpos monoclonales. En el año 2018, se lanzó al mercado el primer desarrollo basado en esta tecnología (Caplacizumab de Ablynx-Sanofi) lo que sin duda será una revolución en las terapias y tratamientos con anticuerpos y el advenimiento de una nueva herramienta para el control y prevención de enfermedades. En Argentina, contamos con las capacidades tecnológicas y las patentes para generar nuevos fármacos y métodos diagnósticos basados en VHH que estarán a la vanguardia internacional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Centro de Prensa: "Las muertes infantiles en el mundo se han reducido casi a la mitad desde 1990, dice la ONU", 13 de septiembre de 2013. Nueva York/Ginebra, disponible en: 1. <https://www.cdc.gov/healthy-water/global/diarrhea-burden.html>.
2. Dennehy, P. Rotavirus Infection. An Update on Management and Prevention. *Advances in Pediatrics* 59 (2012) 47–74.
3. Estes M K, Greenberg HB. Rotaviruses. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. (2013). *Fields Virology*. Vol. 2, 6th ed. 2013. pp. 1347–1401.
4. Degiuseppe J, Giovacchini C, Stupka J. Red Nacional de Vigilancia de Gastroenteritis Virales. Vigilancia epidemiológica de RV en Argentina: 2009- 2011. *ArchArgPediatr*. 2013;111(2):148-154.
5. Dirección de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles - Ministerio de Salud de la Nación. Fundamentos de la introducción de la vacuna contra rotavirus, Lineamientos técnicos. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/dinacei/index.php/personal-de-salud/manuales-y-lineamientos>. Fecha de consulta: 27/11/2017.
6. Degiuseppe JI, Stupka JA. First assessment of all-cause acute diarrhoea and rotavirus-confirmed cases following massive vaccination in Argentina. *Epidemiology and Infection*. Cambridge University Press; 2018;146(15):1948–54.
7. Norberto D. Giglio. Hospitalization costs associated with diarrhea among children during the period of rotavirus circulation in the Northwest region of Argentina. *Arch Argent Pediatr* 2017;115(6):527-532 / 527.
8. Delacour H, Dubrous P, Koeck J. Noroviruses: A Challenge for Military Forces. *Journal of the Royal Army Medical Corps*. 2010;156:251-254
9. Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci*. 2001 Apr;26(4):230-5
10. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol*. 2009 Aug;198(3):157-74.
11. Maffey L, Vega CG, Miño S, Garaicoechea L, Parreño V. Anti-VP6 VHH: An Experimental Treatment for Rotavirus A-Associated Disease. *PLoS One*. 2016 Sep 7;11(9):e0162351.
12. "BOVINO TRANSGÉNICO QUE PRODUCE LECHE QUE CONTIENE VHH". INVENTORES: VIVIANA PARREÑO / LORENA LAURA GARAICOECHEA / MARINA BOK / CELINA GUADALUPE VEGA / LUCIA ALEJANDRA ROCHA / ANDRES WIGDOROVITZ / MARCELO EDUARDO CRISCUOLO / MAURICIO MARTIN BERRO / CLAUDIO BERNARDO SANTOS. Solicitada en 2018. United States Provisional Patent N° 62/676,795: Solicitud de patente en Argentina N° 20190101433.
13. Vega CG, Bok M, Vlasova AN, Chattha KS, Gómez-Sebastián S, Nuñez C, Alvarado C, Lasa R, Escribano JM, Garaicoechea LL, Fernandez F, Bok K, Wigdorovitz A, Saif LJ, Parreño V. Recombinant monovalent llama-derived antibody fragments (VHH) to rotavirus VP6 protect neonatal gnotobiotic piglets against human rotavirus-induced diarrhea. *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003334.
14. Garaicoechea L, Olichon A, Marcoppido G, Wigdorovitz A, Mozgovoj M, Saif L, Surrey T, Parreño V. Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice. *J Virol*. 2008 Oct;82(19):9753-64.
15. Garaicoechea L, Aguilar A, Parra GI, Bok M, Sosnovtsev SV, Canziani G, Green KY, Bok K, Parreño V. Llama nanoantibodies with therapeutic potential against human norovirus diarrhea. *PLoS One*. 2015 Aug 12;10(8):e0133665.