

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 478**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/569** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/531** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01998832 .8**  
96 Fecha de presentación: **27.11.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1340087**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2003**

54 Título: **Proteínas intramoleculares covalentemente reticuladas, utilizadas como socios de unión en los inmunoensayos**

30 Prioridad:  
**30.11.2000 DE 10059720**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.09.2012**

73 Titular/es:  
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG  
GRENZACHERSTRASSE 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:  
**UPMEIER, Barbara;  
SCHLIEPER, Dittmar y  
DONIE, Frederic**

74 Agente/Representante:  
**Isern Jara, Jorge**

**ES 2 387 478 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Proteínas intramoleculares covalentemente reticuladas, utilizadas como socios de unión en los inmunoensayos

5 La presente invención se refiere al empleo de la transcriptasa inversa del virus HIV covalentemente reticulada, como socio de unión inmunológica en los inmunoensayos, a procedimientos de ensayo inmunológico para la detección de un analito en una muestra, en los que se emplea como socio de unión la transcriptasa de HIV inversa intramolecular covalentemente reticulada, a la transcriptasa de HIV inversa intramolecular covalentemente reticulada, así como a un procedimiento para la obtención de esta transcriptasa inversa.

10 El empleo de proteínas como socios de unión para la detección de analitos en procedimientos de ensayo para inmunodiagnóstico, es ya conocido desde hace tiempo. En todos los inmunoensayos habituales, la muestra se incubaba con uno o varios socios de unión específica para los analitos. El socio o los socios de unión se unen específicamente a los analitos que hay que detectar. En el caso de la detección de un anticuerpo -por ejemplo, en el caso de una infección por HCV- la muestra que se va a investigar se pone en contacto por ejemplo con un antígeno HCV, el cual se une específicamente al anticuerpo anti-HCV que se quiere detectar. En una detección de antígeno como por ejemplo en la detección del marcador tumoral del antígeno específico de la próstata (PSA) la muestra se pone en contacto con los anticuerpos los cuales se unen específicamente al PSA en la muestra.

15 A continuación tiene lugar en todos los inmunoensayos la detección del analito. Esto puede lograrse por ejemplo mediante la unión y seguidamente la detección de otro socio de unión provisto de un marcador detectable, el cual se forma en el complejo que forman el analito y el socio de unión inmunológica.

20 En general los inmunoensayos se efectúan en un formato de ensayo heterogéneo u homogéneo. Los formatos de ensayo heterogéneos se efectúan a menudo como un ensayo sándwich o un ensayo puente. También se conocen procedimientos competitivos en los cuales o bien el analito o bien el socio de unión específico del complejo formado por el analito y el socio de unión específico, son desplazados por ejemplo mediante la adición de un análogo marcado del analito.

25 Es importante que en todos los procedimientos de ensayo inmunológico, los reactantes empleados como socios de unión inmunológica específica estén en forma estable y que éstos por ejemplo, debido a sus inadecuadas condiciones de almacenamiento no sean destruidos. Este peligro existe en particular cuando las proteínas empleadas como socios de unión específicos están compuestas de varias subunidades. Las subunidades pueden mantenerse unidas covalentemente como por ejemplo mediante puentes de disulfuro, o no covalentemente, por ejemplo mediante puentes de hidrógeno, cargas opuestas y/o interacciones hidrófobas.

30 En algunos casos tienen lugar inestabilidades y desnaturalizaciones en las condiciones de almacenamiento de las materias primas necesarias para el ensayo inmunológico (por ejemplo, en el reactivo líquido), en las soluciones de trabajo preparadas para el ensayo o en los alrededores de la propia reacción inmunológica. Estas conducen a que tanto la estructura terciaria como la estructura cuaternaria de las proteínas, cambien, de manera que la materia prima ya no puede emplearse en el inmunoensayo.

35 Entre las condiciones desfavorables está la separación de las subunidades inherentes a las proteínas empleadas como socios de unión específicos. Esta disociación de sus unidades puede ser causada en el caso de puenteados covalentes de manera natural, por ejemplo, por reducción de los puentes de disulfuro mediante los aditivos tampón habituales como el DTT.

40 Todavía es mayor de todas formas el peligro de disociación de las subunidades unidas covalentemente de una proteína, que se mantienen juntas mediante las cargas o las interacciones hidrófobas. En estas proteínas puede desencadenarse la disociación de las subunidades muy fácilmente mediante adiciones corrientes de tampón, como sales o detergentes, o por desfavorables fluctuaciones del pH y de la temperatura. Una subunidad individual, casi sin apoyo, está por ello también expuesta a la desnaturalización. A consecuencia de ello, la estructura terciaria de la proteína o respectivamente de la subunidad individual, puede cambiar de forma importante. Esto significa que también las propiedades inmunológicas, como por ejemplo la acción de accesabilidad de importantes epítopos, cambia tan radicalmente, que la proteína empleada en el inmunoensayo como socio de unión, ya no reconoce más inmunológicamente, lo cual significa que ya no se une específicamente.

45 Otro peligro de la disociación de las subunidades consiste en que debido al ajuste del equilibrio químico las subunidades provistas de diferentes grupos de marcado se reasocian de nuevo. Si en el caso concreto de una proteína compuesta de dos subunidades para emplear en una detección de anticuerpos en el formato de ensayo puente por un lado se derivatiza para emplear en una fase sólida universal, y por otro lado la misma proteína es empleada también como componente dador de una señal, y para esta finalidad se copula con un marcador (por ejemplo una enzima, un marcador de fluorescencia o quimioluminiscencia), puede suceder lo siguiente: que la curva de calibración, producida al principio con muestras positivas (muestras que contienen el analito), se vuelva cada vez más plana durante el transcurso del tiempo. Las señales de las pruebas negativas (valores en blanco), crecen y se aproximan a los valores de las pruebas positivas anteriores cada vez más, de manera que ya no es posible

reconocer ninguna diferenciación entre las muestras sin analito y las muestras que contienen analito.

En la solicitud de patente alemana DE 26 15 349 se describe un procedimiento para la modificación química de las enzimas mediante la reacción con quinonas. Estas modificaciones producen un aumento de estabilidad, lo cual tiene como consecuencia una mejor actividad enzimática. De esto se deduce que la reticulación de las moléculas de enzima tiene lugar entre sí, es decir intermolecularmente, pero también intramolecularmente. La obtención de epítomos inmunoreactivos no juega aquí ningún papel. El empleo de enzimas modificadas con quinonas en los procedimientos inmunodiagnósticos, no se describe.

Debyser y De Clercq (Protein Science ("Ciencia de las Proteínas") 1996, 5, pags. 278-286) describen la reticulación de las dos subunidades de la transcriptasa inversa (RT) de HIV-1 mediante el suberimidato de dimetilo, con lo cual las cadenas laterales de lisina, están unidas entre sí. La finalidad de la reticulación es la investigación de la dimerización de las dos subunidades RT. Solamente los dímeros de RT son enzimáticamente activos. La reticulación covalente de las dos subunidades tiene lugar por el contrario en diferentes inhibidores. Según la efectividad del inhibidor se originan después de la reacción química de reticulación más o menos fuertes moléculas de RT reticuladas o respectivamente multímeros. El efecto de la reticulación sobre los epítomos inmunológicamente relevantes, o el empleo de moléculas reticuladas en el inmunoensayo no juegan ningún papel.

En la patente EP-A-0 331 068 se da a conocer el empleo de inmunoglobulinas reticuladas intermolecularmente en ensayos inmunológicos. Es decir, varias moléculas de inmunoglobulina o respectivamente sus fragmentos se unen covalentemente entre sí. Los multímeros de los anticuerpos o respectivamente sus fragmentos, se emplean como reactivo de supresión. Las inmunoglobulinas reticuladas o respectivamente sus segmentos deben eliminar los factores que estorban dirigidos a las inmunoglobulinas en los sueros humanos.

Las proteínas reticuladas descritas en el estado actual de la técnica, las cuales en condiciones naturales constan de varias subunidades, no son adecuadas para el empleo como antígenos o respectivamente como socios de unión inmunológicos o sólo son adecuadas con condiciones, puesto que en general los multímeros intermoleculares constan de varias moléculas de proteína. Estos multímeros son adecuados solamente en ciertas condiciones en los ensayos inmunológicos, puesto que su tamaño, la mayor parte de las veces, no está definido exactamente. Los multímeros existen con ello solamente en una distribución estadística de tamaños, es decir existen mono, di, tri, tetrámeros, uno junto a otro en un conjunto. Mediante la reticulación indefinida se puede llegar a ocultar los epítomos. Esto puede conducir a que por ejemplo un anticuerpo de la muestra a detectar no pueda unirse al epítomo oculto del antígeno, y con ello puede obtenerse un resultado falsamente negativo.

Otro problema en el empleo de multímeros como socios de unión inmunológica es el hecho de que aumenta el riesgo de una unión inespecífica de factores de confusión con las proteínas multímeras, que están presentes en la muestra. Factores de confusión como por ejemplo factores reumáticos tienen a menudo varios puntos débiles de unión afines. Si se emplean ahora proteínas multímeras como socios de unión inmunológica, esto puede conducir a que en particular los factores de confusión encuentren muchos puntos de agarre, es decir puntos de unión en las proteínas multímeras. Como consecuencia de esto pueden obtenerse resultados del ensayo falsamente positivos y en conjunto puede disminuir de manera importante la especificidad del inmunoensayo. La finalidad perseguida es la de preparar proteínas perfeccionadas con respecto a su estabilidad, las cuales puedan emplearse como socios de unión en los inmunoensayos. Las proteínas así perfeccionadas deben poseer una buena accesibilidad a los epítomos, y debe ser preservada la especificidad del procedimiento de detección inmunológico en el cual se emplean las proteínas.

El problema se resuelve mediante la invención descrita en las reivindicaciones independientes. La reivindicaciones dependientes representan versiones preferidas.

Se ha visto sorprendentemente que se pueden preparar prácticamente exclusivamente transcriptasas inversas intermolecularmente reticuladas de HIV sin pérdida de sus propiedades inmunológicas y que éstas pueden ser empleadas de manera ventajosa en procedimientos de ensayos inmunológicos como socios de unión inmunológica. Los problemas de estabilidad de las proteínas que aparecen sin reticulación se evitan con ello en gran medida. La invención se refiere

por lo tanto al empleo de las transcriptasas inversas covalentemente intermolecularmente reticuladas de HIV, como socios de unión inmunológica en procedimientos de ensayo inmunológicos.

La transcriptasa inversa de HIV tiene tendencia debido a sus pliegues, es decir a su estructura terciaria o cuaternaria a perder su plegado en las condiciones de un ensayo inmunológico, al desnaturalizarse o al disociarse en sus distintas subunidades. En un cambio estructural de este tipo existe el peligro de que los epítomos inmunológicamente importantes se modifiquen de tal forma que por ejemplo ya no puedan unirse específicamente a los anticuerpos. En el caso más desfavorable, esto significa que un ensayo inmunológico resulte negativo, es decir no señale la presencia del anticuerpo que se quiere detectar, puesto que las proteínas empleadas como socios de unión, están desnaturalizadas. Esta desventaja se evita en gran manera mediante el empleo según la invención de las proteínas covalentemente intramolecularmente reticuladas.

Según la invención, se emplea la transcriptasa inversa de HIV, con muy particular preferencia la transcriptasa inversa de HIV-1.

5 La procedencia de la transcriptasa inversa puede ser de cualquier naturaleza deseada. Las proteínas que han de reticularse pueden ser de fuentes naturales, por ejemplo pueden aislarse de un organismo o un virus. Se prefiere sin embargo, el empleo de métodos tecnológicos génicos de proteínas obtenidas recombinantemente. Muy particularmente preferida es una RT obtenida recombinantemente, la cual se expresa a partir de un clon de expresión, como se describe por ejemplo en Müller et al., en J. Biol. Chem. 264/24: 13975 – 13978 (1989).

10 En las proteínas intramolecularmente covalentemente reticuladas es importante, que para el reconocimiento inmunológico del epítipo es decisivo que mediante el reticulado no varíen o varíen solamente muy poco, de manera que el otro socio de unión inmunológica en el ensayo reconozca igualmente como buena la proteína reticulada y se una específicamente como la proteína sin reticular. Mediante el reticulado no debe aparecer tampoco ningún artefacto inmunológicamente importante, que pueda falsear el resultado del ensayo.

15 Con la denominación de proteína, se incluyen todos los polipéptidos, que constan por lo menos de aproximadamente 50 aminoácidos, de preferencia por lo menos 100 aminoácidos. Las proteínas modificadas, que están unidas por ejemplo a radicales de azúcares, ácidos siálicos o estructuras lípidas, están igualmente comprendidas dentro del concepto de proteínas.

20 Con el concepto "proteínas intramolecularmente covalentemente reticuladas" se incluyen las proteínas cuya cadena de polipéptidos están unidos entre sí mediante modificación química, de manera que ésta ya no puede desmoronarse, es decir su estructura terciaria y con ello la accesibilidad de los epítopos importantes no desaparece.  
25 En el caso de una proteína que se compone de varias subunidades, la reticulación intermolecular covalente, actúa de manera que tanto la estructura terciaria como también la estructura cuaternaria, se mantienen. Las diferentes cadenas de polipéptidos ya no pueden difundirse entre sí debido a la modificación.

30 Es esencial que la unión covalente solamente tenga lugar dentro de una molécula de proteína.

En la transcriptasa inversa la cual consiste en varias subunidades, tiene lugar la unión según la invención solamente entre aquellas unidades que también de manera natural forman una molécula intacta de proteína. Es decir el tamaño o respectivamente el peso molecular de la proteína covalentemente intermolecularmente reticulada, según la invención, aumentan muy poco mediante la substancia química a reticular. Están prácticamente excluidas las uniones que tienen lugar por medio de varias moléculas de proteína, de manera que forman oligopolímeros o incluso polímeros de las proteínas

35 Según la invención, las proteínas reticuladas pueden estar provistas antes o después de la reticulación con otros grupos de modificación, los cuales por ejemplo son necesarios para emplear como antígenos marcados o para la unión de las proteínas reticuladas con una fase sólida. A título de ejemplo pueden citarse aquí la unión con biotina o estreptavidina o con grupos marcadores que dan una señal como las enzimas, grupos fluorescentes o quimioluminiscentes. Estas modificaciones son familiares para el experto. Mediante estas modificaciones no deben cambiar las propiedades inmunológicas de las proteínas intramolecularmente reticuladas según la invención, o solamente deben alterarse de modo que se garantice siempre el reconocimiento mediante los socios de unión específicos en el inmunoensayo..

40 La unión casi exclusivamente intramolecular de las proteínas puede detectarse en particular para las proteínas con estructuras cuaternarias, por ejemplo, mediante SDS electroforesis sobre gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), con la consiguiente tinción de azul Coomassie. Después de la reticulación de la proteína según la invención, en un gel de SDS-PAGE, no debe ser reconocible a simple vista ningún peso molecular más grande que el que corresponde al peso molecular natural de la proteína. Si se emplea por ejemplo un gel con gradiente de SDS poli(acrilamida), miniaturizado, adquirible comercialmente, de un 8 a un 25% de poli(acrilamida) del sistema Phast<sup>TM</sup> de la firma Pharmacia, la cantidad aplicada de proteína por cada huella es de aproximadamente 500 ng. Con esta cantidad no se puede reconocer en este sistema según la invención a simple vista ningún peso molecular mayor que el que corresponde al peso molecular natural. En las proteínas que de manera natural contienen varias subunidades, es decir varias cadenas de polipéptido, el peso molecular de una banda después de la reticulación no debe sobrepasar la suma de los pesos moleculares de la subunidades. Las bandas de proteína sobre el gel las cuales tienen un peso molecular, que corresponde a la suma del peso molecular de las subunidades, pueden ser consideradas como detección para una correcta reticulación intermolecular de una proteína con una estructura cuaternaria. Mediante el ensayo SDS-PAGE puede detectarse por lo tanto, por un lado la correcta reticulación intermolecular de una proteína formada por varias subunidades y por otro lado la ausencia de multímeros,

45 Otra posibilidad de detectar la ausencia de multímeros, lo ofrece la cromatografía de permeación sobre gel, también llamada cromatografía de exclusión sobre gel, la cual puede efectuarse por ejemplo mediante un aparato de HPLC adquirible en el comercio. El complejo proteínico que presenta un peso molecular que corresponde a un multímero de la proteína individual, se eluyen claramente antes que la proteína presente individualmente. Dichos multímeros

deben según la invención estar presentes solamente en un pequeño tanto por ciento. Medido en la integral de un cromatograma de HPLC, esto significa que los multímeros solamente pueden estar en una proporción de hasta aproximadamente un 5 por ciento medidos en el pico eluído (integral) de la proteína intramolecularmente reticulada según la invención.

5 Como socios de unión inmunológicos están comprendidas todas las moléculas que con las condiciones de un ensayo inmunológico pueden unirse específicamente a otras moléculas. En particular deben poderse unir específicamente socios de unión inmunológica específicamente a los analitos o a una sustancia unida a los analitos. Una constelación clásica es la unión específica de un anticuerpo a un antígeno, por ejemplo la unión de un anticuerpo anti-PSA al PSA. Tanto el anticuerpo como también el antígeno representan socios de unión inmunológica. Según la invención, se emplea la transcriptasa covalentemente intramolecularmente reticulada (transcriptasa inversa de HIV), como socio de unión inmunológica en inmunoensayos. De preferencia se emplean los antígenos como socios de unión inmunológica, cuando debe tener lugar la detección de un anticuerpo dirigido contra estos antígenos. De preferencia, debe citarse aquí la detección, detallada en un párrafo más adelante, de los anticuerpos de RT anti HIV mediante la transcriptasa inversa de HIV reticulada según la invención.

20 Es objeto de la invención también un procedimiento de ensayo inmunológico para la detección de un analito en una muestra. El procedimiento se caracteriza porque como socio de unión inmunológico se emplea la transcriptasa intramolecularmente covalentemente reticulada (transcriptasa inversa de HIV). Se ha visto que las proteínas intramoleculares covalentemente reticuladas en particular aquellas que de manera natural constan de varias subunidades, bajo las condiciones de un ensayo inmunológico, son claramente más estables que las proteínas sin reticular.

25 Los diferentes formatos y versiones de inmunoensayos así como los diferentes procedimientos de detección como por ejemplo mediante reacciones enzimáticas, sustancias fluorescentes o quimioluminiscentes son corrientes para el experto y por consiguiente no necesitan aquí ninguna aclaración especial. Según la invención, se elige un formato de ensayo heterogéneo, el cual tiene lugar después de efectuar la reacción inmunológica de la reacción de separación de la fase sólida de la fase líquida.

30 De preferencia, se trata en el caso del procedimiento, de un inmunoensayo para el diagnóstico de infecciones por HIV. Cuando existe en un paciente una infección HIV, ésta puede detectarse gracias a los anticuerpos formados contra el determinado antígeno del virus, en una muestra de sangre, de suero o de plasma. A menudo se pueden detectar también los propios antígenos del virus del HIV, como por ejemplo el antígeno p24 del HIV-1. Para ello es necesario el empleo del anticuerpo específico dirigido contra el antígeno del HIV, aquí el anticuerpo dirigido contra el p24.

35 A menudo tiene lugar la detección de una infección por HIV en una muestra como ensayo de detección del antígeno y del anticuerpo combinados. Estos ensayos reciben también el nombre de combi ensayos. En la patente WO 98/40744 se da a conocer un combi ensayo de este tipo. Aquí se detectan tanto el antígeno HIV, es decir el antígeno p24 de HIV-1 ó respectivamente HIV-1 subtipo O, y el correspondiente antígeno p26 de HIV-2 mediante los anticuerpos específicos, como también los anticuerpos dirigidos contra el HIV contra la proteína de la cubierta (env) del patógeno como gp160, gp 120, gp 41 de HIV-1, y gp140, gp 110, gp 36 de HIV-2. Además, se detectan en el combi ensayo según la patente WO 98/40744 también anticuerpos contra la RT de HIV. Como socio de unión inmunológico se emplea aquí la transcriptasa inversa de HIV-1 obtenida recombinantemente, la cual no está sin embargo unida covalentemente intramolecularmente.

Según la invención, se emplea la RT de HIV unida covalentemente intermolecularmente, con particular preferencia, una RT de HIV-1 en un combi ensayo, para la detección de una infección por HIV en una muestra.

50 Igualmente es objeto de la invención, la transcriptasa inversa de HIV, covalentemente intramolecularmente reticulada, una enzima la cual está presente en la naturaleza en dos subunidades. La RT de HIV está presente en condiciones naturales como heterodímero. La RT de HIV-1 consta de una subunidad de 51 kDa y una subunidad de 66 kDa. La forma recombinante está disponible por ejemplo mediante un clon de expresión (por ejemplo a partir de Müller et al. 1989 en J. Biol., Chem., 264/24, págs. 13975 - 13978). Debido a su grado de homología de aproximadamente un 60%, en algunas secciones incluso un 100 % sobre el nivel de aminoácidos, la RT de HIV-1 puede en general emplearse también para reconocer los anticuerpos dirigidos contra la RT de HIV-2. La denominación HIV comprende las HIV-1, HIV-2, así como todos los subtipos y subgrupos del virus como por ejemplo el HIV-1 subtipo O. Se prefiere la RT de HIV-1 en la forma covalentemente intramolecularmente reticulada.

60 Se ha visto de manera sorprendente que mediante la reticulación covalente intramolecular de la RT de HIV en las condiciones del inmunoensayo, ésta es claramente más estable que en forma no reticulada. También las cargas de temperatura, como por ejemplo aquellas a las que está expuesto en un almacenamiento más largo o un almacenamiento inadecuado o también en las condiciones del ensayo, la RT según la invención resiste claramente mejor que en la forma sin reticular. La RT covalentemente intramolecularmente reticulada según la invención, se caracteriza porque las dos subunidades están unidas covalentemente entre sí de manera que no existen ningunas uniones intermoleculares de varias moléculas. La detección de que no existe ningún oligómero de varias moléculas

de RT, puede por ejemplo efectuarse mediante la ya citada cromatografía de exclusión sobre gel ó mediante la SDS-PAGE.

5 Como reactivos de reticulación se emplean de preferencia los homo y heterofuncionales "linker" ("eslabones"). En particular son preferidos el MHS (3-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimidoéster), el EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), el DSS (suberato de disuccinimidilo), el HSAB (N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato), el sulfo-SANPAH (sulfo-succinimidil-6(4'-amido-2'-nitrofenilamido)hexanoato) para la reticulación intramolecular de la RT. Como ya se ha mencionado, es importante que mediante la reacción química del linker reticulante tenga lugar solamente una reticulación intramolecular de la proteína o respectivamente de las dos subunidades de la RT, pero no una reticulación de varias moléculas RT entre sí. Además es importante que mediante la reacción química no se destruya ningún epítipo inmunológicamente importante.

Igualmente es objeto de la invención un procedimiento para la preparación de la transcriptasa inversa de HIV intermolecularmente reticulada. El procedimiento comprende los siguientes pasos:

- 15 - preparación de la RT en forma disuelta
- eventualmente, reacción de la RT con un reactivo de bloqueo para los grupos HS
- diálisis de la mezcla frente a un tampón acuoso
- reacción de la RT activada con un uno de los reactivos de reticulación MHS (3-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimidoéster), EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), DSS (suberato de disuccinimidilo), HSAB (N-hidroxisuccinimidil-4-azido benzoato), sulfo-SANPAH (sulfosuccinimidil-6(4'-amido-2'-nitrofenilamido) hexanoato)
- 20 - eventualmente, interrupción de la reacción
- separación de los reactantes en exceso del producto de reacción, mediante diálisis
- eventualmente, exposición del producto de reacción dializado, con luz UV.

25 La estequiometría preferida de la RT para el reactivo de reticulación es de aproximadamente 1:1 hasta 1:20. La relación de los reactantes se escoge de tal forma que no tiene lugar ninguna o solamente una despreciable pequeña oligomerización de varias moléculas de RT entre sí.

30 La figura 1 muestra el análisis del peso molecular obtenido después de la reticulación de la RT, mediante cromatografía de permeación sobre gel.

Los siguientes ejemplos aclaran todavía más la invención.

#### 35 Ejemplo 1

Reticulación intramolecular de la transcriptasa inversa de HIV-1

##### 40 a) Reticulación con MHS

La transcriptasa inversa de HIV-1 (10 mg/ml) está presente disuelta en 50 mM de dietanolamina, pH 8,8, 25 mM de NaCl, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA. El valor del pH se ajusta por adición de un 1 M de solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 6,4.

45 Mediante la adición de un correspondiente alícuota de una solución 1 M de NMM (N-metil-maleinimida) en DMSO, se amplía la mezcla hasta 5 mM de NMM, y a continuación se incuba durante 60 minutos a 25 °C, con agitación. A continuación tiene lugar una diálisis frente a 50 mM de dietanolamina, pH 8,8, 25 mM de NaCl.

50 El valor del pH se corrige ahora mediante la adición de una solución 1M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  hasta pH 7,0. A partir del MHS (3- maleimidobenzoil-N- hidroxisuccinimidéster), se prepara una solución madre en DMSO (5 mg/ml). Se añade a la mezcla, la cantidad correspondiente a una relación estequiométrica de 1:8 (moles de transcriptasa inversa / moles de MHS) de esta solución, y ésta se incuba de nuevo durante 60 minutos a 25 °C, con agitación. La reacción se interrumpe aumentando la mezcla de reacción hasta 10 mM de lisina, con una nueva incubación durante 30 minutos. La separación de los reactantes en exceso tiene lugar mediante diálisis frente a 10 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 6,0, 50 mM de NaCl, 1 mM de EDTA.

60 Después de la diálisis se ajusta el valor del pH mediante la adición de un alícuota de una solución 1M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 7,4, la mezcla se incuba de nuevo durante 4 horas a 25 °C, con agitación, antes de añadir cisteína hasta 2 mM. Después de otros 30 minutos de incubación se interrumpe la reacción mediante la adición de NMM (hasta 5 mM). La mezcla se dializa frente a 50 mM de dietanolamina, pH 8,8, 25mM de NaCl.

##### b) Reticulación con EDC

65 La transcriptasa inversa de HIV-1 (10 mg/ml) está presente disuelta en 50 mM de dietanolamina, pH 8,8, 25 mM de NaCl, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA. El valor del pH se ajusta a pH 6,4 por adición de una solución 1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Mediante la adición de un correspondiente alícuota de una solución 1 M de NMM (N-metil-maleinimida) en DMSO, se aumenta la mezcla hasta 5 mM de NMM, y a continuación se incuba durante 60 minutos a 25 °C, con agitación. A continuación, tiene lugar una diálisis frente a 10 mM de tampón de fosfato de potasio , pH 7,0, 50 mM de NaCl.

5 A partir de la (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), se prepara una solución madre en DMSO (2 mg/ml). La cantidad correspondiente a una relación estequiométrica de 1:10 (moles de transcriptasa inversa / moles de EDC) de esta solución se añade a la mezcla, y esta se incuba de nuevo durante 60 minutos a 25 °C, con agitación. La separación de los reactantes en exceso tiene lugar mediante diálisis frente a 25 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 7,0, 50 mM de NaCl.

10

c) Reticulación con DSS

La transcriptasa inversa de HIV-1 (10 mg/ml) está presente disuelta en 50 mM de dietanolamina, pH 8,8, 25 mM de NaCl, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA. El valor del pH se ajusta a pH 6,4 por adición de una solución 1 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

15

Mediante la adición de un correspondiente alícuota de una solución 1 M de NMM (N-metil-maleinimida) en DMSO, se aumenta la mezcla hasta 5 mM de NMM, y a continuación se incuba durante 60 minutos a 25 °C, con agitación. A continuación, tiene lugar una diálisis frente a 10 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 8,0, 25 mM de NaCl.

20

A partir de DSS (suberato de disuccinimidilo), se prepara una solución madre en DMSO (2 mg/ml). La cantidad correspondiente a una relación estequiométrica de 1: 10 (moles de transcriptasa inversa / moles de DSS) de esta solución se añade a la mezcla, y esta se incuba de nuevo durante 60 minutos a 25 °C con agitación. La separación de los reactantes en exceso tiene lugar mediante diálisis frente a 25 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 7,0, 50 mM de NaCl.

25

d) Reticulación con HSAB

La transcriptasa inversa de HIV-1 (10 mg/ml) está presente disuelta en 50 mM de dietanolamina, pH 8,8, 25 mM de NaCl, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA. El valor del pH se ajusta a pH 6,4 por adición de una solución 1 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

30

Mediante la adición de un correspondiente alícuota de una solución 1 M de NMM (N-metil-maleinimida) en DMSO, se aumenta la mezcla hasta 5 mM de NMM, y a continuación se incuba durante 60 minutos a 25 °C, con agitación. A continuación, tiene lugar una diálisis frente a 10 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 8,0, 25 mM de NaCl.

35

A partir de HSAB (N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato), se prepara una solución madre en DMSO (2 mg/ml). La cantidad correspondiente a una relación estequiométrica de 1: 5 (moles de transcriptasa inversa / moles de HSAB) de esta solución se añade a la mezcla, y ésta se incuba de nuevo durante 60 minutos a 25 °C con agitación. La separación de los reactantes en exceso tiene lugar mediante diálisis frente a 25 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 7,0, 50 mM de NaCl.

40

La mezcla se expone a continuación durante 7 minutos a la luz de una lámpara UV.

e) reticulación con sulfo-SANPAH

45 La transcriptasa inversa de HIV-1 (10 mg/ml) está presente disuelta en 50 mM de dietanolamina, pH 8,8, 25 mM de NaCl, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA. El valor del pH se ajusta a pH 6,4 por adición de una solución 1 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Mediante la adición de un correspondiente alícuota de una solución 1 M de NMM (N-metil-maleinimida) en DMSO, se aumenta la mezcla hasta 5 mM de NMM, y a continuación se incuba durante 60 minutos a 25 °C, con agitación. A continuación, tiene lugar una diálisis frente a 10 mM de tampón de fosfato de potasio , pH 8,0, 25 mM de NaCl.

50

A partir de sulfo-SANPAH (sulfosuccinimidil-6(4'-amido-2'-nitrofenilamido)hexanoato)), se prepara una solución madre de DMSO (4 mg/ml). La cantidad correspondiente a una relación estequiométrica de 1 : 5 (moles de transcriptasa inversa / moles de sulfo-SANPAH) de esta solución se añade a la mezcla, y esta se incuba de nuevo durante 60 minutos a 25 °C, con agitación. La separación de los reactantes en exceso tiene lugar mediante diálisis frente a 25 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 7,0, 50 mM de NaCl.

55

La mezcla se expone a continuación durante 7 minutos a la luz de una lámpara UV.

60 Ejemplo 2

Detección de la reticulación exclusivamente intramolecular de la transcriptasa inversa de HIV-1

a) electroforesis sobre gel en presencia de SDS

65

Se analizaron alícuotas de la transcriptasa inversa intramolecularmente reticulada de HIV-1, mediante electroforesis

sobre gel de poliacrilamida, en presencia de SDS en un aparato Phast-Gel (firma: Pharmacia<sup>TM</sup>) según una descripción estándar del fabricante.

El control sin reticular tiene exclusivamente bandas con pesos moleculares de 66 kD y 51 kD, los cuales corresponden a la subunidades de la transcriptasa inversa. La transcriptasa inversa intramolecularmente reticulada puede reconocer bandas con pesos moleculares de 110-120 kD, lo cual demuestra una reticulación satisfactoria de las subunidades entre sí. Mayores complejos de proteína no son detectables, es decir con el procedimiento de reticulación según la invención no tiene lugar el puentado intermolecular de varias moléculas de transcriptasa inversa.

#### b) Cromatografía analítica de permeación sobre gel

Se analizó un alícuota de la transcriptasa inversa intramolecularmente reticulada de HIV-1, mediante una cromatografía de permeación sobre gel en una columna TSK 3000 (Toso Haas<sup>TM</sup>) mediante un aparato de HPLC según una prescripción estándar del fabricante.

La transcriptasa inversa intramolecularmente reticulada es eluída de la columna con un tiempo de retención que corresponde a las proteínas globulares con pesos moleculares de 100-130 kD (en este caso, 7,5 minutos). Complejos mayores de proteína, que presentarían un tiempo de retención más corto en el cromatograma, no son detectables, es decir, con el procedimiento de reticulación según la invención, no tiene lugar un puentado intermolecular de varias moléculas de transcriptasa inversa en estructuras de oligómeros o polímeros. El cromatograma está representado en la figura 1.

#### Ejemplo 3

Derivatización de la transcriptasa inversa de HIV-1 intramolecularmente reticulada, en un ejemplo de marcado con biotina

La transcriptasa inversa de HIV-1 intramolecularmente reticulada (ver el ejemplo 1) está presente en el tampón de dietanolamina o en el tampón de fosfato de potasio. La RT sin reticular se trata como comparación con la N-metilmaleimida y se dializa frente a la dietanolamina. Si es necesario, se ajusta en todas las mezclas de RT mediante la adición de NaOH, un valor del pH de pH 8,6-8,8. Se prepara una solución madre de biotina-DDS (diaminodioxaoctan-disuccinimidil suberato de biotinilo) (6 mg/ml). Se añade a la mezcla, la cantidad correspondiente a una estequiometría de relación de 1:4 (transcriptasa inversa en moles / de biotina-DDS en moles) de esta solución, y se incuba de nuevo durante 60 minutos a 25 °C con agitación. La reacción se interrumpe por aumento de la mezcla de reacción hasta 10 mM de lisina y una nueva incubación durante 30 minutos. La separación de los reactantes en exceso tiene lugar mediante diálisis frente a 50 mM de dietanolamina, pH 8,8, y 25 mM de NaCl.

#### Ejemplo 4

Ensayo de estabilidad en el ensayo funcional

Para la comprobación de la estabilidad de la transcriptasa inversa de HIV-1 se efectuó un inmunoensayo en el Elecsys® de la firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim. Se midieron junto con el control negativo (NK) que no contenía ningún anticuerpo anti RT, y un control positivo (PK), que contenía anticuerpos anti RT, dos sueros humanos positivos de HIV con reactividad anti RT.

Para ello se incubaron 45 µl de muestra juntamente con 55 µl de reactivo 1 (RT biotinilado) y 55 µl de reactivo 2 (RT marcado con rutenio) durante 9 minutos a 37 °C. A continuación, se añadieron perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina, y la mezcla se incubó durante 9 minutos más. A continuación tuvo lugar una captura magnética de las perlas y la determinación cuantitativa de la señal electroquimioluminiscente.

Para comprobar comparativamente la estabilidad de la transcriptasa inversa biotinilada en la forma reticulada y sin reticular según la invención, antes de la ejecución del ensayo 1 se cargó el reactivo (RT biotinilada) durante el tiempo dado de 18 horas a 42 °C. Como valor de referencia se tomó un reactivo 1 preparado al mismo tiempo y almacenado a 4 °C. Todos los otros reactivos se utilizaron para el ensayo, recién preparados.

La evaluación tiene lugar mediante la dinámica de la señal, es decir se determina el cociente de la señal recibida y del correspondiente control negativo. Cuanto más grande es el valor de la dinámica de la señal tanto mejor puede tener lugar una diferenciación entre los anticuerpos positivos del HIV y las muestras negativas. Es deseable por lo tanto, una dinámica grande de la señal.

Para la comparación de la RT con carga de temperatura y la RT sin carga de temperatura se emplearon los correspondientes valores en relación entre sí. Los resultados están representados en la tabla 1.

Tabla 1

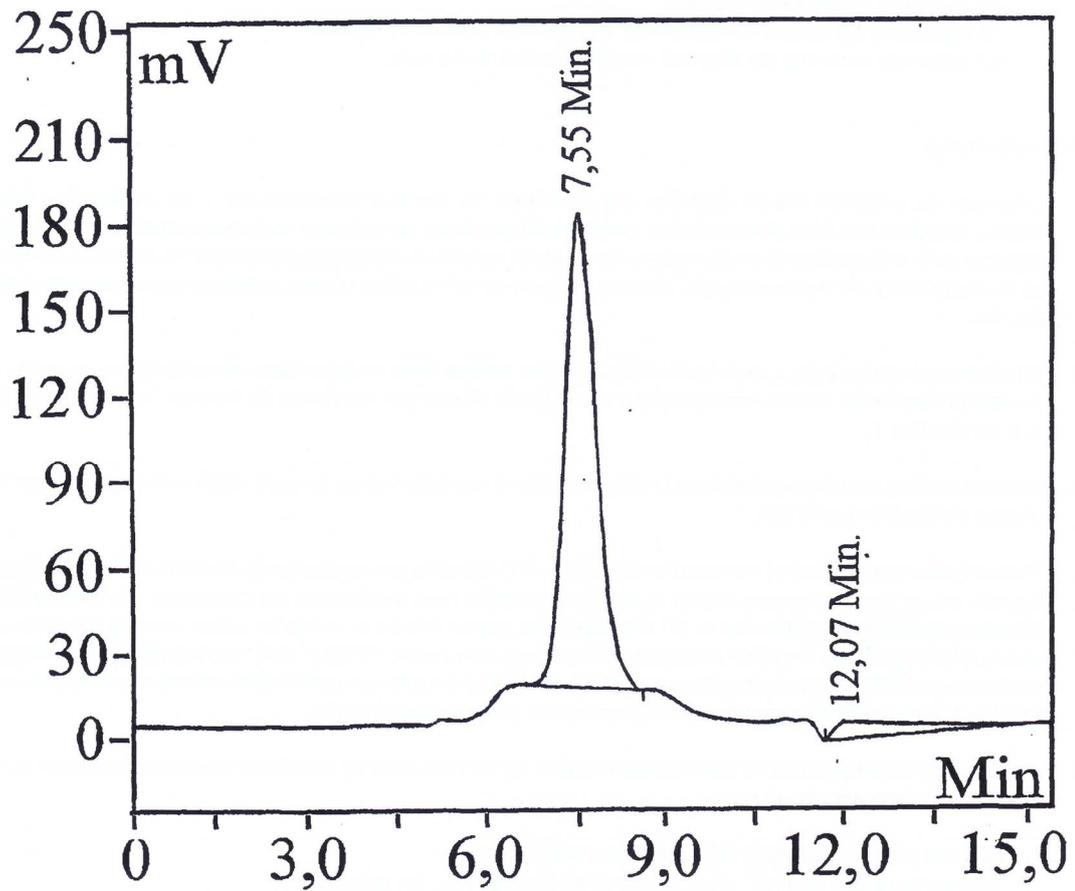
<b>RT-Bi(DDS) de HIV-1 recombinante; no reticulada</b>						
	Sin carga de temperatura		Carga de temperatura de 18 horas a 42 °C		Comparación con carga de temperatura/sin carga de temperatura	
Muestras	Cuentas	Dinámica de la señal	Cuentas	Dinámica de la señal	Cuentas	Dinámica de la señal
Control negativo	1763	1,0	1049	1,0	60%	100%
Control positivo	16848	9,6	1480	1,4	9%	15%
Suero de HIV 1	6209	3,5	1054	1,0	17%	29%
Suero de HIV 2	5162	2,9	917	0,9	18%	30%
Suero de HIV 3	5832	3,3	1150	1,1	20%	33%
Suero de HIV 4	111444	63,2	6267	6,0	6%	9%
<b>RT(MHS)-Bi(DDS) de HIV-1 recombinante; reticulada según la invención</b>						
	Sin carga de temperatura		Carga de temperatura durante 18 horas a 42 °C		Comparación con carga/sin carga	
Muestras	Cuentas	Dinámica de la señal	Cuentas	Dinámica de la señal	Cuentas	Dinámica de la señal
Control negativo	1304	1,0	1206	1,0	92%	100 %
Control positivo	73335	56,2	77611	64,4	106%	114%
Suero de HIV 5	8476	6,5	7092	5,9	84%	90%
Suero de HIV 6	14504	11,1	10615	8,8	73%	79%
Suero de HIV 7	69459	53,3	59347	49,2	85%	92%
Suero de HIV 8	168674	129,4	168304	139,6	100%	108%

- 5 Se observa que también después de varias horas de carga de temperatura a una temperatura elevada en comparación con la RT sin carga de temperatura, la dinámica de la señal en el inmunoensayo con la RT reticulada según la invención es todavía por lo menos un 79%, de preferencia por lo menos un 90%, mientras que la dinámica de la señal referida al control negativo en la RT sin reticular es solamente como máximo, aproximadamente un 30%, en parte claramente por debajo del 30% ó incluso por debajo del 20%. Las señales descienden cuando se emplea la RT sin reticular a un nivel de suero negativo, mientras que la RT reticulada según la invención mantiene su función inmunológica. Los epítomos de la RT reconocidos por los anticuerpos de la muestra, permanecen invariables en gran parte a pesar de la carga de temperatura. Esto significa que la RT reticulada según la invención es claramente más estable que la RT sin reticular.
- 10

## REIVINDICACIONES

1. Empleo de las proteínas de virus covalentemente intramolecularmente reticuladas, mediante una modificación química, como antígenos en la detección de un anticuerpo dirigido contra este antígeno en un procedimiento de ensayo inmunológico en un formato de ensayo heterogéneo, en el cual después de efectuada la reacción inmunológica, tiene lugar la separación de la fase sólida de la fase líquida, **caracterizado porque**, como antígeno, se emplea la transcriptasa de HIV inversa.
2. Procedimiento de ensayo inmunológico para la detección de un analito en una muestra, **caracterizado porque**, como socio de unión inmunológica se emplea un antígeno covalentemente intramolecularmente reticulado según la reivindicación 1.
3. Método de ensayo inmunológico de acuerdo con lo reivindicación 2, **caracterizado porque**, es un método para el diagnóstico de infecciones de HIV.
4. Transcriptasa inversa covalentemente intramolecularmente reticulada (RT) de HIV, en la cual exclusivamente las dos subunidades de RT están covalentemente reticuladas entre sí y no está presente ninguna ligazón intermolecular entre distintas moléculas de RT, **caracterizada porque**, como reactivo de reticulación se emplea el MHS (3-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimidéster), el EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), el DSS (suberato de disuccinimidilo), el HSAB (N-hidroxi-succinimidil-4-azidobenzoato), ó el sulfo-SANPAH (sulfosuccinimidil-6(4'-amido-2'-nitrofenilamido) hexanoato).
5. Procedimiento para la obtención de la transcriptasa inversa intramolecularmente reticulada HIV según la reivindicación 4, el cual comprende los siguientes pasos:
  - (a) preparación de la RT en forma disuelta
  - (b) reacción de la RT con un reactivo de bloqueo para los grupos –SH
  - (c) diálisis de la mezcla frente a un tampón acuoso
  - (d) reacción de la RT activada con el reactivo de reticulación MHS (3-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimidéster), el EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimid), el DSS (suberato de disuccinimidilo), el HSAB (N-hidroxi-succinimidil-4-azidobenzoato)), ó el sulfo-SANPAH (sulfosuccinimidil-6(4'-amido-2'-nitrofenilamido)hexanoato), en donde se escoge una estequiometría de la RT respecto al reactivo de reticulación, de 1:1 hasta 1:20
  - (e) eventualmente, interrupción de la reacción
  - (f) separación de los reactantes en exceso del producto de reacción mediante diálisis
  - (g) eventualmente, exposición del producto de reacción dializado, con luz UV.

Fig. 1/1



Pico nº :	Tiempo de retención [minutos]	Area relativa [ % ]
1	7,55	91,66
2	12,07	8,34