

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 200**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2002 E 02782543 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **01.09.2004 EP 145158**

54 Título: **Procedimiento para la determinación de dosis de un antibiótico in vitro por medio de mecanismos de regulación genética y kit de diagnóstico correspondiente**

30 Prioridad:

06.12.2001 EP 01870273

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.01.2013

73 Titular/es:

**UNISENSOR S.A. (50.0%)
Route de Bonsgnée 145
4120 Rotheux-Rimiere, BE y
GESVAL S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GRANIER, BENOÎT y
LEPAGE, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 394 200 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).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la determinación de dosis de un antibiótico *in vitro* por medio de mecanismos de regulación genética y kit de diagnóstico correspondiente.

5

Objetivo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento que utiliza total o parcialmente *in vitro* elementos conocidos pertenecientes a los mecanismos de regulación de la expresión de los genes, que tendría principalmente como campo de aplicación el reconocimiento y la determinación de dosis de moléculas específicas tales como antibióticos.

10

La invención también se refiere a un kit de diagnóstico que pone en práctica el procedimiento.

Antecedentes científicos

15

Los sistemas de regulación genética naturales se definen como mecanismos que pueden modular la expresión de los genes en función de la presencia o la ausencia de determinadas moléculas específicas en el entorno celular.

20

La expresión de los genes puede controlarse a lo largo de las etapas de transcripción, de elongación y de traducción de los ácidos nucleicos (figura 1).

25

Se distingue el control negativo y el control positivo de la transcripción. En el primer caso, un receptor proteico, denominado represor, impide que el gen se exprese fijándose sobre el operador del mismo e impide así que la ARN polimerasa inicie la transcripción en el promotor. Este sistema es muy frecuente en las bacterias (TetR, VarR, LacI).

30

En el segundo caso, se necesita un activador o factor de transcripción que se fija en el ADN para iniciar la transcripción. Este sistema es frecuente en las eucariotas (por ejemplo receptores hormonales) pero también está presente en las bacterias, como es el caso del activador AmpR que regula la transcripción de la β -lactamasa AmpC en las bacterias Gram negativas tales como *Citrobacter freundei* (Jacobs *et al.*, Cell, vol. 88 (1997), págs. 823-832) o de PurR (Schumacher *et al.*, Cell, vol. 83 (1995), págs. 147-155). De manera análoga, la traducción también puede regularse mediante la fijación de un represor en el ARNm que impide que el ribosoma inicie la traducción en proteínas. En las eucariotas, la elongación del ARNm puede regularse además durante las etapas de modificación, "corte y empalme", transporte o estabilidad.

35

Los reguladores son entidades proteicas que pueden encontrarse en 2 estados: o bien en un estado activado (RTA) en el que pueden, fijándose en el ADN o el ARNm, regular de manera positiva (+) o negativa (-) la expresión de los genes, y por tanto la síntesis de las proteínas, o bien en un estado inactivado (RTI) en el que ya no pueden unirse a una secuencia nucleotídica particular. La activación se debe generalmente a una transición alostérica del represor en función de la presencia o la ausencia de un ligando de alta afinidad en un sitio específico del regulador. Es el caso de los reguladores bacterianos pertenecientes a la familia LacI (Weickert and Adhya, J. Biol. Chem., vol. 267 (1992), págs. 15869-74) o de los receptores hormonales en las eucariotas. Otros fenómenos bioquímicos tales como la oxidación, la fosforilación o la glicosilación también pueden "iniciar" estos reguladores.

40

En este caso del mecanismo asociado a la fijación de un ligando, los reguladores presentan dos sitios de fijación:

45

- por un lado un sitio de fijación al ADN con frecuencia caracterizado por un motivo expuesto de hélice α -giro β -hélice α (HTH), característico de las proteínas que se unen al ADN;
- por otro lado un sitio de fijación al ligando.

50

La presencia del ligando, denominado efector, en el regulador induce generalmente una modificación de conformación del mismo que va a permitir (o por el contrario impedir) la fijación de este regulador sobre una secuencia nucleotídica determinada. Estos efectores actúan por tanto como inductores o co-represores. Estos casos más frecuentes se ilustran en las figuras 2A y 2B.

55

Es el caso de la purina, co-represor necesario para la fijación del represor dimerico PurR, perteneciente a la familia de los reguladores transcripcionales bacterianos LacI, sobre el operador PurF (Schumacher *et al.*, Cell, vol. 83 (1995), págs. 147-155; Schumacher *et al.*, Science, vol. 266 (1994), págs. 763-770) o del L-triptófano, co-represor del dímero Trp (Otwiniowski *et al.*, Nature, vol. 335 (1988), págs. 321-329).

60

La mayor parte de los otros reguladores bacterianos de la familia de LacI, con la excepción de PurR, reprimen una ruta catabólica y no biosintética, siendo la afinidad de los reguladores por el operador superior en ausencia de ligando en el represor. Por tanto, los reguladores TetR y VarR son dímeros que también pertenecen a la familia LacI que intervienen en los mecanismos de resistencia bacteriana frente a los antibióticos tetraciclinas y virginiamicinas respectivamente. Estos represores, que presentan por otro lado una gran homología de secuencia, pueden fijarse a los operadores "tet" y "var" únicamente en ausencia de sus ligandos respectivos, tetraciclina o derivados y

65

virginiamicina S considerados efectores inductores (Hillen *et al.*, Ann. Rev. Microbiol., vol. 48 (1994), pág. 345; Namwat *et al.*, J. Bac., vol. 183 (mar. de 2001), págs. 2025-2031).

En presencia de un inductor fijado, los reguladores “sueltan” el operador e inmediatamente se eleva la represión. Se observa una síntesis de TetA y de VarS, transportadores de membrana que catalizan el transporte de los antibióticos fuera de la célula. Este sistema necesita una sensibilidad muy controlada ya que regula la toxicidad del transportador que a la vez va a impedir que el antibiótico alcance su diana (el ribosoma) pero también puede soltar otros iones no específicos fuera de la célula, lo que también es mortal para la célula. Por tanto, TetR debe mantener una gran represión sobre TetA hasta que esté presente un bajo nivel de tetraciclina (Tc).

En cuanto a TetR, se conoce la estructura tridimensional en presencia de Tc así como en presencia del operador (Hinrichs *et al.*, Science, vol. 264 (1994), págs. 418-420; Kisker *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 247 (1995), págs. 260-280; Orth *et al.*, Nature Structural Biol., vol. 7 (2000), págs. 215-219). Permite comprender mejor la maquinaria molecular. Se requiere una orientación precisa de una cadena lateral de los aminoácidos terminales para permitir un contacto de alta afinidad entre la región operadora del ADN y el regulador. Cuando se fija la tetraciclina, la distancia de centro a centro entre los dos motivos de HTH del dímero de TetR aumenta 5 Å y esta ligera modificación de estructura es suficiente para interrumpir el contacto de alta afinidad con el operador. Los estudios *in vitro* muestran que la afinidad de TetR por el operador en ausencia de Tc es de 10^{12} a 10^{13} M⁻¹ y disminuye en un factor de $\sim 10^9$ en presencia de Tc. TetR constituye el sistema de regulación transcripcional inducible más eficaz conocido en la actualidad (Orth *et al.*, Nature Structural Biol., vol. 7 (2000), págs. 215-219).

Por otro lado, debe observarse que en función de las homologías de secuencia, se conocen seis clases (A, B, C, D, E y G) de TetR en las bacterias Gram negativas. Los genes que codifican para estos receptores son plasmídicos o se portan por transposones y todos son inducibles a concentraciones nanomolares en tetraciclina. Las proteínas presentan el 29% de aminoácidos idénticos entre las diferentes clases lo que supone una estructura 3D probablemente similar (Hillen *et al.*, Annu. Rev. Microbiol., vol. 48 (1994), págs. 345-332; Klock *et al.*, J. Bac., vol. 161 (1985), págs. 326-332).

En cuanto a VarR, aún no se conocen los parámetros de afinidad en presencia y en ausencia de inductor pero es probable que sean del mismo orden de magnitud. Dado que la afinidad del antibiótico por su diana, el ribosoma 50S, es similar, un alto delta entre la represión y la inducción del transportador de membrana también es vital para la célula.

Otros represores menos vitales tales como LacI sólo muestran una pérdida de actividad de 10^5 en presencia del inductor (Matthews *et al.*, Nature Structure Biol., vol. 7 (2000), págs. 184-187).

Una vez más, debe observarse que existen excepciones ya que AmpR fijado al operador puede activar la transcripción *in vitro* en ausencia de ligando o en presencia del ligando tripéptido anhidro-Mur-Nac. Por el contrario, en presencia de otro ligando de AmpR, el pentapéptido UDP-Mur-Nac, se inhibe la transcripción (Jacobs *et al.*, Cell, vol. 88 (1997), págs. 823-832). AraC se fija en el ADN en presencia y en ausencia de ligando (L-arabinosa) pero la transcripción sólo se inicia en presencia de ligando tras una “formación de bucle” de ADN (Soisson *et al.*, Science, vol. 276 (1997), págs. 421-425).

Aún otros represores, tales como MetJ, se fijan en el operador únicamente en presencia del co-represor cargado positivamente (s-adenosilmetionina) que no induce un cambio de conformación sino un efecto electrostático a nivel del regulador, lo que aumenta su afinidad en más de 1000 veces por el ADN (Phillips and Phillips, Structure, vol. 2 (1994), págs. 309-316).

Técnica anterior

Actualmente, ninguna invención, es decir ninguna coordinación de medios técnicos, ha demostrado la posibilidad o la viabilidad de aprovechamiento del conjunto de las moléculas, ni en particular únicamente algunas moléculas, implicadas en los mecanismos de regulación genética, para el desarrollo de herramientas de diagnóstico *in vitro* con el objetivo de detectar la presencia y/o de cuantificar el contenido de determinadas sustancias eventualmente presentes en una muestra que va a analizarse.

La presente invención no pretende recurrir a ningún desarrollo celular en cultivo para funcionar y no puede referirse a las aplicaciones en las que es el propio mecanismo de regulación genético el que se clona y se aprovecha *in vivo* en una cepa bacteriana o una línea celular. En este último caso muy particular, en efecto no puede evitarse el desarrollo celular o el crecimiento bacteriano en medio nutritivo para permitir *in vivo* la expresión del mecanismo de regulación genética. Determinadas aplicaciones de este tipo informan de la posibilidad, partiendo de células genéticamente recombinantes, de realizar mediciones y de determinar eventuales sustancias presentes en una muestra. Es concretamente el caso para la determinación de dosis de las dioxinas conocida con el nombre de Calux® (Chemical Activated Luciferase gene expression, “expresión del gen de luciferasa químicamente activada”) descrita en la patente americana n.º US-A-5.854.010 (Bioassay for detecting 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-paradioxin and TCDD-like compounds and novel recombinant cell line useful therefor). Este kit de diagnóstico funciona para la

determinación de dosis de las dioxinas y sus derivados (Murk *et al.*, Fundam. Appl. Toxicol., vol. 33(1) (sep. de 1996), págs. 149-60; Bovee *et al.*, Food. Addit. Contam., vol. 15 (8) (nov.-dic. de 1998), págs. 863-75). Según este documento, los inventores han construido un plásmido de expresión en el que han insertado los elementos genéticos de respuesta a la dioxina en el sentido del gen indicador de la luciferasa. El plásmido se transfiere en células epiteliales de ratón. Son estas líneas celulares las que se utilizan en un procedimiento para el análisis cuantitativo del contenido de hidrocarburos poliaromáticos en una muestra.

Otro sistema conocido con el nombre de "Tet-Lux" se basa en un principio idéntico (Kurittu *et al.*, J. Food Prot., vol. 63 (7) (jul. de 2000), págs. 953-7). En esta aplicación, es el sistema de regulación de la resistencia a la tetraciclina el que se clona en el sentido de un gen de luciferasa en lugar del gen de resistencia a la tetraciclina. En presencia de tetraciclina en el medio de crecimiento de las células recombinantes, el gen de luciferasa puede expresarse y, con ayuda de luciferina, se emite luz. En ausencia de tetraciclina, el sistema regulador está cerrado y no se produce ninguna luz.

El documento US-A-6 133 027 describe composiciones y procedimientos para la expresión inducible de un polipéptido citotóxico para la célula huésped eucariota en la que se expresa el polipéptido. La secuencia de nucleótidos que codifica para dicho polipéptido está conectada a un cebador compuesto por múltiples copias de tetO, el sitio de fijación del represor de tetraciclina TetR. El sistema de expresión es celular.

TetR-tetO constituye el sistema de regulación transcripcional más sensible conocido actualmente. La potencia de los sistemas inducibles (Tet) frente a la tetraciclina también ha permitido desarrollar un procedimiento de elección para las investigaciones transgénicas. Se utilizan con frecuencia como herramienta para regular genes diana particulares en eucariotas (Stebbins *et al.*, PNAS, vol. 98(19) (2001) págs. 10775-80; Baron *et al.*, Methods Enzymol. (2000) vol. 327, págs. 401-421). Los autores notifican que una baja presencia de doxiciclina añadida a la alimentación normal de drosófila induce eficaz y rápidamente los transgenes diana en los adultos, las larvas y los embriones.

El principal inconveniente de un procedimiento que requiere un desarrollo celular se encuentra en el periodo necesario para desencadenar la señal medible. Deben contarse varias multiplicaciones celulares y esperar al menos una hora antes de obtener una señal que pueda interpretarse. En determinados casos la muestra también puede contener elementos susceptibles de modificar de manera no específica el crecimiento de las células recombinantes y dar errores o añadir ruido a la medida final. Además, estas células recombinantes son algunas veces inestables y pueden ser sensibles a diversos factores. Por otro lado, su utilización en un kit de ensayo no está adaptada a una manipulación fácil y práctica, sobre todo cuando debe hacerse funcionar la prueba en condiciones de campo. Además, estos tipos de prueba requieren con frecuencia la intervención de un experto o de un operario cualificado para realizar el análisis. Finalmente, los reactivos y los instrumentos que miden la luz emitida son muy molestos.

Objetivos de la invención

La presente invención pretende proporcionar un nuevo procedimiento de diagnóstico que no presente los inconvenientes y las dificultades observados en la técnica anterior.

En particular, la invención pretende proponer la utilización total o parcial de los elementos conocidos de regulación de la expresión de los genes para el desarrollo de procedimientos y/o sustancias, utilizables *in vitro*, cuyo campo de aplicación será principalmente el reconocimiento y la cuantificación de moléculas.

El objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento y un kit de diagnóstico *in vitro* para la detección y la determinación de dosis de de antibióticos tales como las tetraciclinas y las virginiamicinas.

Principales elementos característicos de la invención

Un primer objeto de la presente invención es proponer un kit de detección y/o de cuantificación de un ligando, que se encuentra en una muestra de análisis, mediante un receptor, puesto en práctica *in vitro*, es decir sin expresarse en ningún sistema biológico o celular, y que comprende los siguientes reactivos:

- una secuencia nucleotídica monocatenaria o bicatenaria, y
- dicho receptor constituido por una entidad proteica monomérica o multimérica que comprende al menos un primer sitio de reconocimiento específico para dicho ligando y un segundo sitio de reconocimiento específico para dicha secuencia nucleotídica, siendo dicho segundo sitio distinto del primer sitio, estando dicho receptor configurado para que la fijación de la secuencia nucleotídica en el receptor en dicho segundo sitio de reconocimiento específico se module mediante la fijación del ligando en el receptor en dicho primer sitio de reconocimiento específico.

El ligando es un antibiótico, perteneciente preferentemente a la familia de las tetraciclinas o de las virginiamicinas, o una sustancia relacionada. Se elige entonces como receptor un represor de tetraciclina (TetR) aislado de una

cualquiera de las clases conocidas, es decir A, B, C, D, E y G, o de virginiamicina (VarR), que se utiliza para la determinación de dosis, respectivamente, de las tetraciclinas y de las virginiamicinas.

5 Una característica particularmente ventajosa de la invención es que comprende medios para realizar la cuantificación del antibiótico en un tiempo muy corto, preferentemente menos de 15 minutos, y ello para concentraciones próximas a los límites máximos de residuos permitidos.

10 El receptor también puede ser, según la invención, reguladores eucariotas de transcripción, un mutante de los receptores naturales de tetraciclina o de virginiamicina, o de receptores nucleares.

15 Según la invención, la secuencia nucleotídica es un fragmento bicatenario de secuencia específica de las regiones operadoras de los genes tetA y tetR para el reconocimiento de las tetraciclinas o varA y varR para el reconocimiento de las virginiamicinas, estando dicho fragmento preferentemente situado en el extremo 3' de un elemento constituido por una biotina y por una cadena monocatenaria poli-T.

Según una primera forma de realización preferida de la invención, la secuencia nucleotídica está inmovilizada, directa o indirectamente, sobre un soporte sólido, estando el receptor eventualmente marcado por al menos una molécula.

20 Según una segunda forma de realización preferida de la invención, el receptor está inmovilizado, directa o indirectamente, sobre un soporte sólido, preferentemente con ayuda de un anticuerpo específico y de una proteína A, estando la secuencia nucleotídica eventualmente marcada por al menos una molécula.

25 Ventajosamente, el receptor o la secuencia nucleotídica, según el caso, está marcado/marcada, directa o indirectamente, por medio de un anticuerpo o una biotina. El anticuerpo y la biotina pueden eventualmente marcarse respectivamente por medio de una proteína A y de una molécula que fija la biotina. Preferentemente, este marcaje directo o indirecto se realiza con ayuda de partículas coloreadas tales como partículas de oro coloidales, o con ayuda de una enzima tal como la peroxidasa.

30 Una característica sorprendente de la invención es que no se necesita ningún elemento marcado para una detección, pudiendo detectarse la simple presencia o ausencia del complejo receptor-fragmento nucleotídico mediante un procedimiento fisicoquímico tal como un procedimiento del tipo resonancia de plasmón superficial o la espectrometría de masas.

35 De manera aún más ventajosa, el fragmento nucleotídico, acoplado a una biotina, está asociado a una proteína que fija la biotina, preferentemente la avidina, la estreptavidina, la neutravidina o un anticuerpo anti-biotina, para formar un complejo que se deposita sobre una membrana de nitrocelulosa, definiendo un primer punto de captura para el receptor y la membrana de nitrocelulosa comprende un segundo punto de captura que puede recuperar, total o parcialmente, el exceso de reactivos que no se ha fijado al primer punto de captura.

40 Preferentemente, el segundo punto de captura comprende gammaglobulina, proteína A o anticuerpo anti-proteína A.

45 De manera aún más preferible, el kit de la invención comprende medios para cuantificar, tras la detección, las señales obtenidas en los dos puntos de captura o bien mediante inspección visual, o bien mediante medición óptica (reflectividad, absorbancia, transmisión, fluorescencia, cámara digital, quimioluminiscencia, etc.), o bien mediante resonancia de plasmón superficial, o bien incluso mediante espectrometría de masas.

50 Según una característica de la invención, el receptor comprende un tercer sitio de reconocimiento específico independiente de los sitios de reconocimiento del receptor para la secuencia nucleotídica y para el ligando.

55 El tercer sitio de reconocimiento específico del receptor es ventajosamente un sitio de reconocimiento para otra entidad proteica, preferentemente un anticuerpo o un fragmento específico de anticuerpo, o un sitio de fijación para un ión metálico. La otra entidad proteica que interacciona con el tercer sitio de reconocimiento está marcada, preferentemente por medio de proteína A asociada a partículas de oro coloidales.

60 La invención puede aprovecharse de manera extremadamente práctica cuando el receptor de la secuencia nucleotídica y/o el anticuerpo y/o un fragmento del mismo está marcado por al menos una molécula que permite una detección mediante un procedimiento tal como la inmunoprecipitación, la inmunocromatografía, las detecciones de tipo ELISA o RIA, la formación de un precipitado coloreado resultante de una reacción enzimática, etc.

Teniendo siempre en cuenta el aspecto práctico de la invención, dichos reactivos están preferentemente acondicionados en un matraz liofilizado y sobre un elemento de tipo tira inmunocromatográfica.

65 Alternativamente, el kit también puede estar desprovisto de matraz; dichos reactivos se asocian entonces directamente en el interior del elemento de tira sobre una membrana próxima a su extremo que puede entrar en contacto con un líquido de análisis.

Un segundo objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de detección y/o de cuantificación de un ligando presente en una muestra preferentemente biológica, puesto en práctica por medio del kit descrito anteriormente y caracterizado porque:

- 5 - se pone en contacto dicha muestra con el kit y porque
- se detecta la presencia o se mide la concentración de ligando presente en dicha muestra mediante inmunocromatografía o mediante determinación enzimática de dosis, preferentemente de tipo ELISA, mediante SPR o mediante espectrometría de masas.

10 Este procedimiento presenta la ventaja de que la muestra biológica puede ponerse directamente en presencia de los reactivos del kit sin tener que purificarse previamente. Además, no hay limitación en cuanto a la naturaleza de la muestra biológica utilizada, pudiendo comprender carne, pescado, sangre, suero, un líquido fisiológico, orina, lágrimas, saliva, leche, miel, agua, alimentos para ganado o cualquier otra preparación alimenticia o líquidos de cultivo y fermentación, o incluso preparaciones o derivados de estas sustancias.

Breve descripción de las figuras

20 La figura 1, que se mencionó anteriormente, representa muy esquemáticamente el mecanismo de regulación de la transcripción genética, tal como se produce *in vivo*.

Las figuras 2A y 2B, que se mencionaron anteriormente, representan respectivamente los mecanismos de activación y de inactivación del regulador en presencia de ligando.

25 La figura 3 representa la transposición esquemática simplificada de los mecanismos ilustrados en las figuras 2A y 2B según la presente invención y sus diversas formas de realización preferidas.

La figura 4 representa una curva de determinación de dosis de las tetraciclinas en el músculo de pollo, según la invención.

30 La figura 5 representa gráficamente una determinación de dosis de cuatro moléculas diferentes de tetraciclina mediante el procedimiento n.º 2 de la invención.

35 La figura 6 representa gráficamente los resultados obtenidos mediante la técnica de SPR (resonancia de plasmón superficial).

Mecanismos genéticos en los que se basa la invención

40 La figura 1 presenta el esquema clásico de regulación de la transcripción de un gen de estructura 2. La transcripción 5 de ADN en ARNm se inicia gracias a la fijación de la ARN polimerasa 3 en la región reguladora al principio del gen 1 (promotor/operador). A continuación se induce la traducción 6 de ARNm 4 en las proteínas 7 a nivel de los ribosomas 4'.

45 La activación del regulador 8 en presencia de un ligando 9, inductor, se describe en la figura 2A. Cuando el regulador transcripcional inactivo (RTI) 8 se fija al promotor 1, tras haberse fijado el ligando 9, para dar un regulador transcripcional activo (RTA) 10, hay una activación o no de la transcripción del gen según si el RTA es respectivamente un activador o un represor transcripcional.

50 La inactivación del regulador 8 en presencia de un ligando 9, co-represor, se describe en la figura 2B. Cuando el RTA 10 se fija al promotor 1, hay una activación de la transcripción o no según si el RTA es respectivamente un activador o un represor transcripcional. La fijación del ligando 9 en el RTA 10 provoca su disociación del promotor 1, dando RTI 8, 9, lo que induce respectivamente la represión o la activación del gen.

Descripción detallada de una forma de realización preferida de la invención

55 La presente invención se basa en la utilización de una entidad proteica monomérica o multimérica, generalmente originaria de mecanismos conocidos de regulación genética, que porta varios sitios distintos de reconocimiento y cuyo estado de reactividad de un sitio, con respecto a su propio ligando, puede modular la reactividad de otro sitio de reconocimiento de esa misma entidad proteica. En el caso particular de la invención, se trata de un reconocimiento para un fragmento de ácido nucleico por un lado y para un ligando por otro lado, pudiendo la fijación del ligando modular negativamente (es decir impedir) el reconocimiento de la secuencia de ADN por la entidad proteica.

65 En otras palabras, la invención se basa en la utilización en la técnica de diagnóstico *in vitro* de complejos del tipo "secuencia de ADN - regulador - ligando" para la detección de sustancias relacionadas con o que se derivan de la molécula de ligando.

La presente invención presenta la ventaja de no recurrir a la expresión de un sistema biológico *in vivo*, y no requiere la utilización de líneas celulares particulares.

5 Por tanto, la presente invención aprovecha las propiedades conocidas de los sistemas de regulación genética pero en una tecnología totalmente diferente y mucho mejor adaptada a una prueba rápida. En efecto las moléculas biológicas se ponen en práctica *in vitro* sin recurrir a ninguna infraestructura ni desarrollo celular, ni expresión de sistema biológico *in vivo*. Son los tres elementos clave, a saber ácido nucleico/receptor/ligando eventual, originarios de los sistemas de regulación, los que colocados en un entorno externo a cualquier viabilidad celular pueden expresar su funcionalidad fuera del contexto celular. En una aplicación particular, que se refiere a la determinación de dosis de las tetraciclinas, se han recuperado los reactivos de base, presentados en una única mezcla, directamente en la muestra de análisis y se ha obtenido la respuesta en 5 minutos.

15 La figura 3 simplifica la descripción de la invención presentando los diversos enfoques propuestos en la presente solicitud de patente. La figura 3 esquematiza en su expresión más sencilla, por un lado, el conjunto de los elementos clave que sostienen la invención y por otro lado el conjunto de los elementos indispensables para detallar a continuación las formas de realización particulares de la invención.

Los elementos clave son tres:

- 20 - en primer lugar una entidad proteica que puede reconocer una molécula de unión y un fragmento de ácido nucleico,
- en segundo lugar una molécula de unión (ligando) que puede a su vez reconocer la entidad proteica afectada y
- 25 - en tercer lugar un fragmento de ácido nucleico, ADN o ARNm, que la entidad proteica también puede reconocer.

Por tanto hay dos sitios de reconocimiento distintos portados por una entidad proteica que puede presentarse en forma o bien monomérica, o bien multimérica, y preferentemente multimérica.

30 En la figura 3 se distingue por tanto una entidad proteica A que puede reconocer específicamente una secuencia de ácido nucleico B y fijarse al mismo o bien únicamente en la presencia, o bien únicamente en ausencia del ligando C. Cuando C se fija a A, entonces el complejo AC ya no puede fijarse a B o incluso A se suelta de B. En el caso contrario (no ilustrado), es únicamente el complejo AC el que permite que A se una a B y en ausencia de C, A se separa de B.

Por tanto, un fragmento B de ácido nucleico puede reconocerse por A, o bien en un primer caso únicamente en ausencia de C, o bien en otro caso únicamente en presencia de C.

40 Un ligando C específico de A puede fijarse a A independientemente del estado de la interacción de A y B. Su fijación a A impide que A se fije a B u obliga al complejo AB previamente formado a disociarse, o en el caso contrario, es la formación del complejo AC la que permite la fijación de AC a B para formar el complejo ACB. Una disminución de la concentración de C obliga al complejo ACB a disociarse completamente.

45 También puede haber otro sitio D de reconocimiento, externo e independiente del sitio de reconocimiento de A para B y para C. Puede ser un sitio de reconocimiento para otra entidad proteica, generalmente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, que puede fijarse a A independientemente de una fijación de B o C a A. También puede tratarse por ejemplo de un sitio de fijación para un ión metálico o cualquier otra proteína. De manera similar, puede haber otro sitio D' de reconocimiento del ADN (B) que desempeña el mismo papel que D pero con respecto a B.

50 Puede incluso haber un enlace artificial E unido a A, o bien mediante acoplamiento químico o bien por ejemplo mediante ingeniería genética o proteica. Este enlace no modifica la funcionalidad de A (con respecto a B, C y D). Este enlace puede servir de punto de anclaje de A a cualquier otra molécula o bien para marcar A o bien para fijar A a un soporte por ejemplo. El enlace artificial E' desempeña el mismo papel que E, pero con respecto a B.

55 De una manera general, la presente invención se aplica a las técnicas de diagnóstico que requieren habitualmente dos elementos principales, a saber un elemento de captura y un elemento de marcaje. Estos dos elementos son suficientes para derivar todo un conjunto de posibilidades que permitirán finalmente describir y sostener la tesis presentada en la presente invención.

60 Según la presente invención, todos los elementos descritos en el esquema de la figura 3 (A, B, C, D, D', E y E'), sin ninguna excepción, pueden o no, cada uno, estar inmovilizado y servir de punto de captura, o estar marcado. La inmovilización directa o indirecta sobre un soporte cualquiera permite la recuperación eventual, parcial o total, del complejo en presencia y ello independientemente del estado del complejo formado. El marcaje directo o indirecto mediante cualquier molécula o partícula o incluso mediante un conjunto cualquiera de moléculas o partículas, permite identificar o visualizar directa o indirectamente la formación eventual del complejo en presencia y ello

independientemente del complejo formado, sobre el elemento de captura. En un caso particular, el elemento de captura y/o el elemento de marcaje no son indispensables ya que es la simple presencia o ausencia física del complejo formado lo que se detecta mediante técnicas más sofisticadas tales como técnicas fisicoquímicas de tipo espectrometría de masas (SM) o de tipo resonancia de plasmón superficial (SPR) por ejemplo.

5 En general, si uno de los elementos está inmovilizado para permitir la recuperación eventual del complejo en presencia, es otro elemento el que se modificará eventualmente para servir de marcador del complejo en presencia y viceversa.

10 El marcaje puede realizarse concretamente con ayuda de partículas coloreadas para una detección en el contexto de una aplicación en inmunocromatografía, con ayuda de enzima marcadora para una detección en el contexto de una aplicación de tipo ELISA, o incluso realizarse mediante una molécula fluorescente para una detección en el contexto de una aplicación con detección de fluorescencia. En el caso en el que se utilizan procedimientos fisicoquímicos (por ejemplo: SM, SPR, etc.), el marcaje externo no es necesario ya que estos procedimientos
15 pueden detectar la presencia o la ausencia de complejos moleculares.

En general, la inmovilización de uno cualquiera de los elementos puede realizarse sobre un soporte:

- 20 - de tipo membrana natural o sintética (nailon, PVDF, nitrocelulosa, etc.),
- de tipo superficie plástica (policarbonato, poliestireno, PVP, PVC, polipropileno, etc.),
- 25 - de tipo partículas magnéticas, o partículas de látex, de tipo superficie metálica o de vidrio, de cerámica o de sílice, etc., ya sea directa o indirectamente por medio de cadenas de polímeros (por ejemplo: dextrano, PEO,...) o incluso de cualquier "espaciador" químico.

Ejemplos

30 La presente invención se ilustra mediante tres ejemplos clave en los que se considera que el ligando del receptor es la molécula que va a detectarse en la muestra de análisis. En el caso de los ejemplos, el ligando es la tetraciclina presente en la muestra que va a analizarse.

35 El primer ejemplo ilustra la determinación de dosis de la tetraciclina en la carne mediante un procedimiento inmunocromatográfico. Una variante de este ejemplo también funciona para la determinación de dosis en la leche o cualquier otro producto derivado de la leche, pero también en el pescado, en el suero u otro líquido fisiológico, en la sangre, la orina, las lágrimas o la saliva. La técnica descrita en este ejemplo también puede funcionar en versión de ELISA o el marcaje del receptor puede realizarse por medio de una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina, etc.), o bien directamente, o bien indirectamente con ayuda del sistema biotina-avidina.

40 El segundo ejemplo ilustra la determinación de dosis de la tetraciclina en productos lácteos mediante un procedimiento ELISA. Una variante de este ejemplo también funciona para la determinación de dosis en la carne, el pescado, el suero o cualquier otro líquido fisiológico, la sangre, las lágrimas, la orina, la saliva. La técnica también puede funcionar en versión inmunocromatográfica en la que el marcaje del ADN se realiza entonces por medio de un anticuerpo anti-biotina o de una avidina o estreptavidina o uno de sus derivados, marcado con oro coloidal.

45 El tercer ejemplo demuestra que es posible detectar la presencia de tetraciclina en disolución por medio de una técnica de tipo fisicoquímico, preferentemente el procedimiento de resonancia de plasmón superficial (SPR), sin tener que recurrir a un marcaje cualquiera. En efecto en este caso es la presencia o la ausencia de complejo receptor-ADN lo que se pone directamente en evidencia.

50 Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la presente invención en el caso de la determinación de dosis *in vitro* de la tetraciclina en la carne (procedimiento inmunocromatográfico).

55 Principio de base

60 El fragmento de ADN B está inmovilizado y el receptor A está marcado, o bien directamente por una biotina E, o bien indirectamente por un anticuerpo D y una proteína A conjugada a partículas de oro coloidales. La tetraciclina que va a detectarse constituye el ligando C ilustrado en la figura 3. En el presente ejemplo, la herramienta tecnológica de revelado utilizada es una prueba inmunocromatográfica, pero una versión similar mediante marcaje enzimático también funciona con ELISA. El ejemplo ilustra una determinación de dosis de las tetraciclinas en carne, pero la determinación de dosis funciona exactamente de la misma manera si la muestra es una matriz biológica cualquiera.

65 A continuación se describe la preparación de los elementos necesarios.

1.1 El receptor.

TetR es un receptor de la tetraciclina (Tc) particularmente interesante. Es un homodímero constituido por 2 subunidades idénticas de 27 kD cada una. Por un lado, es específico de la tetraciclina. En efecto, este receptor proteico presenta como función *in vivo* fijarse a la tetraciclina presente en el citoplasma lo que desencadena el mecanismo de resistencia a la tetraciclina. Por otro lado, presenta una afinidad muy elevada por la tetraciclina y sus derivados (K_a que vale de 10^9 a $100 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$). El complejo formado también presenta el interés de ser relativamente estable ($t_{1/2} \geq 2 \text{ h}$ a 37°C). La afinidad de la Tc por otras macromoléculas tales como los ribosomas, dianas celulares de esos antibióticos, es netamente más baja (10^6 M^{-1}).

TetR es una proteína localizada en el citoplasma de las bacterias Gram negativas resistentes a la tetraciclina. Por tanto, es un homodímero (Hillen *et al.*, J. Mol. Biol., 169 (1983), págs. 707 - 721) constituido por 2 subunidades idénticas, que presentan cada una:

- una cabeza de fijación a los operadores de los genes *tetA* y *tetR* orientados en tándem, estando el motivo hélice α - giro β - hélice α (HTH) característico de las proteínas que se unen al ADN situado en la región N-terminal de TetR;
- una cavidad de fijación al complejo $(\text{Mg-Tc})^+$ (Kaszycki *et al.*, J. Prot. Chem., vol. 15 (1996), págs. 607 - 619).

Sólo las moléculas de tetraciclina complejadas con un catión divalente (Mg^{2+}) pueden fijarse a un dímero de TetR. Un dímero de TetR se fija a 2 moléculas de Tc con la misma afinidad (Degenkolb *et al.*, A.A.C., vol. 35 (1991), págs. 1591 - 1595).

La formación del complejo TetR-Tc es óptima entre pH 7,5 y 12 y disminuye a pH $< 7,5$. A pH 5, el represor es inactivo (Hillen *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 257 (1982), págs. 6605 - 6613). El complejo permanece estable hasta 50°C .

Los complejos TetR-Tc y TetR-ADN se han cristalizado y sus estructuras tridimensionales se conocen con una resolución de 2,5 Å (Hinrichs *et al.*, 1994; Kisker *et al.*, 1995, Orth *et al.*, 2000). Se dispone por tanto de numerosas informaciones estructurales sobre estos complejos.

En ausencia de $(\text{Mg-Tc})^+$ en TetR, los 2 dominios de HTH pueden fijarse al ADN con una afinidad muy elevada que se estima *in vivo* que es de aproximadamente 10^{11} M^{-1} (Orth *et al.*, 2000). Por el contrario, en presencia del complejo $(\text{Mg-Tc})^+$ en TetR, la distancia de centro a centro entre los motivos de HTH aumenta $\sim 5 \text{ \AA}$, lo que impide que el dímero TetR se fije a la región operadora del ADN. Entonces se reduce la afinidad de TetR por el ADN en un factor de $\sim 10^9$.

TetR-tetO constituye el sistema de regulación de la transcripción inducible más eficaz conocido actualmente, lo que hace de TetR un receptor de elección para la tetraciclina y de tetO una secuencia nucleotídica de anclaje potencialmente ideal para TetR [Orth *et al.*, 2000, Matthews *et al.*, Nature Struct. Biol., vol. 7(3) (mar. de 2000) págs.184-187].

Acaba de describirse un sistema de regulación idéntico en *Streptomyces*, como mecanismo de resistencia a la virginiamicina, un dímero VarR homólogo a TetR y que contiene 2 motivos de HTH que pueden fijarse a un operador en ausencia de antibiótico. Por el contrario, cuando la virginiamicina se une a VarR, un cambio de conformación impide que este último se fije al ADN (Namwat *et al.*, J. Bac., vol. 183 (mar. de 2001), págs. 2025-2031).

1.1.1 Preparación del receptor TetR

En el ejemplo elegido, se ha clonado el gen del receptor de TetR de clase C contenido en el plásmido pSC101 de *E. coli* C600 (disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland, USA) según los procedimientos bien conocidos por el experto en la materia. Basándose en la secuencia nucleotídica, se han seleccionado dos cebadores y se han utilizado para la amplificación mediante PCR del gen que a continuación se ha clonado en un plásmido de expresión pet12a.

Se transforman células competentes HB101 que contienen el plásmido pT7po123, que codifica para la ARN polimerasa del colífago T7, con el producto de la ligación del fragmento de PCR obtenido y del pet12a. Se inducen las células puestas en cultivo en medio LB a $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,8$ mediante un cambio de temperatura a 42°C durante 3 horas.

La estrategia utilizada para obtener la homogeneidad proteica comprende 4 etapas que son respectivamente:

- I) una desintegración celular con ayuda del sistema Constant Basic System,
- II) un intercambiador de iones de tipo Source 15Q PE 4.6/100 de 1,7 ml (Pharmacia),

III) un tamiz molecular Séphacryl S100 (Pharmacia) y

IV) una heparina HiTrap Heparin (Pharmacia).

5 Al final de la purificación, se almacena entonces la proteína pura al 99% a una concentración de 21 μ M en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,9, β -mercaptoetanol 7 mM en presencia de glicerol al 50% v/v y a -20°C.

1.1.2 Marcaje del receptor

10 1.1.2.1 Marcaje mediante biotilación

Se modifica químicamente en la superficie el receptor que reconoce la tetraciclina, preparado anteriormente, mediante adición de una biotina (vitamina H). Se utilizó un derivado de éster de N-hidroxisuccinimida (disponible de Unisensor S.A.). En un caso particular, se realizó la biotilación con el derivado de cisteína mediante la utilización de una biotina-maleimida disponible de Pierce Inc., EE.UU.

La biotilación se realiza según el procedimiento descrito en Bioconjugate Techniques, Hermanson, G.T. (1996), Academic Press, Nueva York. Entonces se dializa el receptor biotilado frente a su tampón de conservación constituido por fosfato de potasio 20 mM, pH 7,9 y β -mercaptoetanol 14 mM. Tras la diálisis, se almacena el receptor en ese mismo tampón diluido 2 veces en presencia de glicerol al 50% v/v.

La puesta en evidencia de la biotina puede realizarse mediante un anticuerpo anti-biotina o estreptavidina o neutravidina acopladas a partículas coloreadas (oro coloidal, látex, celulosa) cuando se trata de una versión de tipo inmunocromatográfico, o acopladas a una enzima (HRP, PA, etc.) cuando se trata de una versión de tipo ELISA.

25 1.1.2.2 Marcaje con ayuda de un anticuerpo anti-TetR

La preparación del anticuerpo se realiza según el procedimiento descrito en Kachab, E.H. *et al.*, The Journal of Immunological Methods, vol. 147, n.º1 (1 de enero de 1992), págs. 33-41.

El revelado de los anticuerpos puede realizarse o bien tras la modificación de los mismos mediante acoplamiento directo al oro (Method Mol. Biol. Totowa, N.J., vol. 115 (1999), págs. 331-334; Colloidal Gold Principles, Methods and Applications, M.A. Hayat, Academic Press) o mediante biotilación y revelado mediante un anticuerpo anti-biotina o neutravidina acoplados de manera enzimática o con ayuda de partículas coloreadas, o bien sin modificar el anticuerpo revelándolo simplemente mediante anticuerpo anti-conejo o proteína A también marcada enzimáticamente o con ayuda de partículas coloreadas.

En los ejemplos para la carne y la leche, se pone una parte de suero no purificado obtenido anteriormente en presencia de una parte de receptor TetR obtenido anteriormente en 1.1.1, de 5 partes de proteína A marcada con ayuda de partículas de oro coloidales de 40 nm y con una DO a 500 nm de 10 (disponible de Unisensor S.A., Lieja, Bélgica) y de 10 partes de tampón de liofilización (Tris 10 mM, pH 8, BSA 5 mg/ml, sacarosa 10 g/l). Se liofiliza esta mezcla durante 20 horas.

En el ejemplo que ilustra la determinación de dosis a partir de muestras de miel, se pone una parte de suero no purificado obtenido anteriormente en presencia de una parte de receptor TetR obtenido anteriormente en 1.1.1, de 15 partes de proteína A marcada con ayuda de partículas de oro coloidales de 40 nm y con una DO a 500 nm de 10 (disponible de Unisensor S.A., Lieja, Bélgica) y de 20 partes de tampón de liofilización (Tris 10 mM, pH 8, BSA 5 mg/ml, sacarosa 10 g/l). Se liofiliza esta mezcla durante 20 horas.

50 1.2 El ácido nucleico

El dímero de TetR presenta 2 motivos de HTH que pueden fijarse a una secuencia específica de ADN, la región operadora de los genes tetR y tetA.

55 En el operón de resistencia a la Tc del transposón Tn10, las regiones operadoras de los genes tetA y tetR que se fijan al receptor TetR están localizadas y se conocen sus secuencias (Hillen *et al.*, 1984).

Mediante alineamiento de secuencia, también se ha localizado esta secuencia conservada en el operador tetA del pSC101 y se ha sintetizado un oligonucleótido de 31 pb que abarca esta región consenso (teta-40) así como otro oligonucleótido de 31 pb de secuencia complementaria al primero (teta-30). El primer oligonucleótido (teta-40) presentará además una cola de poli-T en el sentido de 5' (10T), que seguirá siendo monocatenaria durante el apareamiento de los dos oligonucleótidos, así como una biotina en este extremo 5'.

65 Se han sintetizado un oligonucleótido sintético de 31 pb que presenta un sitio de fijación de TetR al operador tetA del pSC101 así como su complementario biotilado en el sentido de 5' (Eurogentec, Bélgica):

Teta 40: 5'biotina-TTTTTTTTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAATTGCTAA 3'

Teta 30: 3' TTACGCCATCAAATAGTGTCATTAACGATT 5'

5 1.2.1 Preparación del ácido nucleico

Para la hibridación, se mezclan los dos oligonucleótidos complementarios en cantidad equimolar (2×10^{-4} M) en NaCl 0,5 M. Se incuba la mezcla 5 minutos en agua hirviendo y después se enfría lentamente en ese baño María hasta temperatura ambiente con el fin de reducir los apareamientos.

10

1.2.2 Inmovilización del fragmento de ácido nucleico

Se inmoviliza el fragmento de ácido nucleico sobre la avidina por el extremo de una de las cadenas que contienen una biotina. La avidina es una glicoproteína tetramérica aislada de la clara de huevo. Cada subunidad presenta una masa molecular de 16,4 kD y se fija a una molécula de biotina de manera no covalente con una afinidad particularmente elevada ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$).

15

Se ponen los dos oligonucleótidos teta30 y teta40-biotina, previamente hibridados a 10^{-4} M en NaCl 0,5 M, en presencia de avidina a 20 mg/ml en agua con una razón de 10/1 v/v. Se deposita el producto de la reacción sobre una membrana de nitrocelulosa con ayuda de un sistema de deposición comercializado por BioDot Inc., EE.UU.

20

1.3 Descripción de la técnica utilizada

La técnica inmunocromatográfica se conoce y se describe en la bibliografía (Developing Immunochromatographic Test Strips: A short Guide, Millipore, Lit. No. TB500 impreso en los USA 11/96, 96-204). En el caso preciso de la presente invención, se deposita la mezcla obtenida anteriormente (véase el punto 1.2.2) sobre una membrana de nitrocelulosa. Se conoce que las proteínas, y en este caso concretamente la avidina, se fijan mediante interacción dipolar de manera irreversible sobre el soporte de nitrocelulosa. Por otro lado, se conoce que los ácidos nucleicos en forma bicatenaria no participan en la interacción con este mismo soporte. En otras palabras, la mezcla de la avidina - biotina - ácido nucleico es una elección favorable en la que la avidina sirve de anclaje y el ADN permanece libre y accesible para el reconocimiento por una proteína, en el caso del presente ejemplo, el receptor TetR.

25

30

A continuación se coloca la membrana de nitrocelulosa en contacto por los dos extremos con un papel absorbente cualquiera. En la nitrocelulosa se encuentran dos puntos de captura, uno está constituido por la mezcla de avidina - biotina - ADN descrita en el punto anterior y el otro, colocado tras el primero con referencia al sentido de migración del líquido, es una proteína que puede reconocerse por proteína A. Preferentemente esta proteína es una gammaglobulina. Esto constituye el elemento de tira utilizado en el ejemplo 1.

35

En este elemento de tira, el primer punto de captura constituye la zona "de prueba" (línea de prueba) específica de la presencia o de la ausencia de tetraciclina en el medio de reacción y el segundo punto de captura es la zona de "referencia" (línea de control) que puede recuperar el exceso de reactivo no retenido en el primer punto de captura. La apreciación de la cantidad de tetraciclina en la muestra de análisis se realiza mediante interpretación óptica de la superficie de los trazos presentes en los puntos de captura (véase la figura 4).

40

45 1.4 Determinación de dosis de las tetraciclinas en carne mediante el procedimiento 1

A 25 g de músculo de pollo se le añaden 75 ml de tampón Macllvain pH 4 (1 litro de una disolución de ácido cítrico monohidratado a una concentración de 21 g/l y 625 ml de una disolución de NaHPO_4 anhidro a una concentración de 28,4 g/l, ajustándose el pH al valor de 4 con ayuda de NaOH 0,1 M) diluido cuatro veces en agua. Se pica la mezcla con ayuda de una picadora doméstica de tipo SEB Rondo 500 durante 2 minutos. Se recupera la parte triturada en un recipiente Eppendorf para centrifugarse 2 minutos a 6000 rpm en una centrifugadora de tipo Eppendorf. A continuación se incuban 200 μl de sobrenadante en presencia del liofilizado preparado anteriormente (véase el punto 1.1.2.2). Tras dos minutos de incubación a temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$), se sumerge la tira de análisis descrita anteriormente (en 1.3) en la disolución. La interpretación final se realiza tras 8 minutos de incubación con ayuda de un lector óptico de tira disponible de 77-Elektronika (Budapest, Hungría). Los resultados se muestran en la figura 4. Con este procedimiento, pueden detectarse fácilmente muestras de pollo que contienen una pequeña cantidad de tetraciclina del orden de 100 ppb en menos de 15 minutos. La presente invención se refiere a la determinación de dosis de las tetraciclinas con un valor ligeramente inferior al límite máximo de residuo (LMR) permitido en Europa. Por debajo de este valor la prueba proporciona una señal negativa y por encima de este valor la prueba proporciona un resultado positivo.

50

55

60

Se obtuvieron resultados similares con músculo, riñón e hígado procedentes de cerdo, de pollo, de ternera pero también con muestras de pescado y huevos. En el caso en el que se desee respetar el LMR de aplicación para el riñón, el hígado y los huevos, debe diluirse la muestra respectivamente seis (6) veces, tres (3) veces y dos (2) veces en tampón Macllvain descrito anteriormente, diluido ocho veces en agua. Para huevos, no es necesario triturar.

65

Resulta notable constatar que la presente invención propone, a partir de una muestra “sólida”, en este caso un trozo de carne, un procedimiento de cuantificación de antibiótico que puede realizarse en un tiempo muy corto (menos de 15 minutos) y ello para concentraciones que se aproximan, o inferiores, a los límites máximos de residuos (LMR) permitidos.

5

1.5. Determinación de dosis de las tetraciclinas en leche mediante el procedimiento 1

Se incuban 200 µl de leche en presencia de reactivos liofilizados y preparados como en el punto 1.1.2.2. Tras dos minutos de incubación a 37°C, se sumerge la tira de análisis descrita en el punto 1.3 en la disolución. La interpretación final se realiza tras 8 minutos de incubación con ayuda de un lector óptico de tira disponible de 77-Elektronika (Budapest, Hungría). Los resultados se muestran en la tabla I. A 50 ppb, la señal “de prueba” es inferior a la señal “de referencia” y la prueba proporciona un resultado positivo.

10

Concentración de tetraciclina en leche (ppb)	Intensidad de la zona de prueba	Intensidad de la zona de referencia
0	5218	1837
10	4357	1373
20	3620	1787
30	3041	1921
40	2273	2080
50	2023	2402
60	1096	2414
70	985	2189
80	630	2367
90	377	2190
100	399	2123

15

Tabla I

1.6. Determinación de dosis de las tetraciclinas en miel mediante el procedimiento 1.

A 1 gramo de miel se le añaden 3 ml de tampón de dilución (para 1 litro: 2,73 g de Na₂HPO₄·2H₂O, 1,65 g de ácido cítrico, 7 g de BSA y 2,5 g de Tween-20, pH 5) y se agita vigorosamente la disolución para obtener una disolución homogénea. A continuación se incuban 200 µl de esta dilución de la muestra de miel en presencia del liofilizado preparado anteriormente (véase el punto 1.1.2.2). Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente (± 20°C), se sumerge la tira de análisis descrita anteriormente en el punto 1.3 en la disolución. La interpretación final se realiza a simple vista, tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente.

25

La siguiente lista muestra las moléculas de tetraciclina que proporcionan un resultado positivo a 25 ppb (lo que significa que a 25 ppb, la señal “de prueba” es inferior a la señal “de referencia”): clortetraciclina, demedociclina, doxiciclina, metaciclina, oxitetraciclina, rolitetraciclina y tetraciclina.

Ejemplo 2

El ejemplo 2 ilustra la presente invención para la determinación de dosis de las tetraciclinas en la leche (procedimiento ELISA).

Principio de base

En este ejemplo, retomando la nomenclatura de la figura 3, se inmoviliza el receptor A con ayuda de un anticuerpo D y de una proteína A y se marca el ADN B con ayuda de una biotina E' y de avidina peroxidasa. En el presente ejemplo, la herramienta tecnológica de revelado utilizada es una prueba ELISA pero en el caso en el que el marcaje del ADN se realice con ayuda de partículas coloreadas, pueden obtenerse resultados similares con inmunocromatografía. En el ejemplo 2, se utiliza tubos o placas de ELISA. El ejemplo 2 ilustra una determinación de dosis de las tetraciclinas en la leche, pero la determinación de dosis funciona exactamente de la misma manera que si la muestra fuese otra matriz biológica cualquiera.

A continuación se describe la preparación de los elementos necesarios.

2.1 El receptor

El receptor TetR se produce y se purifica según el procedimiento descrito en el punto 1.1.1.

2.1.1 Preparación del soporte de ELISA para la recuperación del receptor

5 Se deposita 1 µg de proteína A presente en 100 µl de tampón de "recubrimiento" (tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6) en cada pocillo de una microplaca disponible de Nunc, Maxisorp F8 (ref.: 468667A) y se incuba una noche a 4°C. Al día siguiente se aspira el sobrenadante.

Se saturan los pocillos durante 30 min. a temperatura ambiente con 200 µl de tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4, BSA al 0,5%, tras lo cual se aspira el sobrenadante y se lavan los pocillos con NaCl 0,15 M, Tween al 0,5%.

10 Finalmente, se añaden 200 µl de tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4, sacarosa al 1% y se incuban 30 min. a temperatura ambiente. A continuación se lavan los pocillos y se secan con aire comprimido y se conservan en un desecador a 4°C protegidos de la humedad.

2.2 Preparación del ADN marcado con la peroxidasa.

15 Se trata de la misma preparación descrita en el ejemplo anterior en el punto 1.2.1 que se pone en presencia de avidina peroxidasa disponible de Pierce Inc. (conjugado de avidina-peroxidasa del rábano inmunopuro, ref. n.º 21123). Se pone la mezcla de reacción descrita a continuación en presencia de 10 picomoles de ADNbc-biotina para 0,61 picomoles de avidina-peroxidasa.

2.3 Preparación de la mezcla de reacción

Se prepara la mezcla de reacción de la siguiente manera: 1 ml de disolución contiene:

25 I) 4,76 µl de receptor TetR 21 µM preparado como anteriormente (en tampón fosfato 10 mM, pH 7,9, - mercaptoetanol 7 mM, glicerol al 50% v/v);

30 II) 2 µl de una disolución de suero compuesta por: 100 µl de suero preparado como en el punto 1.1.2.2, 900 µl de tampón fosfato 10 mM, pH 7 y 1 ml de glicerol;

III) 1 µl de ADN biotinilado tal como se describió en el punto 1.2 (10^{-4} M en NaCl 0,5 M);

35 IV) 2 µl de una disolución de avidina-HRP compuesta por 100 µl de avidina-HRP 1 mg/ml, 900 µl de tampón fosfato 10 mM, pH 7 y de 1 ml de glicerol;

V) 990,24 µl de tampón fosfato 50 mM, pH 7,4, BSA al 0,5%, MgCl₂ 10 mM.

2.4 Determinación de dosis de las tetraciclinas en la leche mediante el procedimiento 2

40 Se ponen 50 µl de leche que va a analizarse en presencia de 100 µl de la mezcla de reacción descrita anteriormente en un pocillo previamente "recubierto" con la proteína A (2.1.1). Se incuba la mezcla 10 min. a temperatura ambiente sobre una mesa agitadora. A continuación se lava el pocillo 4 veces con la disolución de lavado (NaCl 0,15 M, Tween al 0,5%). A continuación se añaden 150 µl de tetrametilbencidina/H₂O₂ 50/50 (KPL Inc., EE.UU.) en el pocillo y se prolonga la incubación durante 30 min. en la oscuridad. Se detiene la reacción de coloración con 50 µl de H₂SO₄ 6 M y se realiza la lectura con ayuda de un espectrofotómetro a 450 nm.

2.5 Determinación de dosis de las tetraciclinas en carne mediante el procedimiento 2

50 Una variante de este ejemplo 2 muestra la determinación de dosis de las tetraciclinas en carne mediante un procedimiento ELISA. En este caso, se prepara la muestra de la siguiente manera: se trituran 5 g de carne añadidos a 15 ml de tampón Macllvain pH 4 (tal como se describió en el punto 1.4) con el aparato Ultra-turrax a 2000 rpm durante 30 segundos. Se centrifugan 2 g (~2 ml) de parte triturada correspondientes a 0,5 g de carne 30 min. a 13000 rpm (15000 g) a 4°C. Se deposita el sobrenadante, que contiene la extracción de las tetraciclinas contenidas en 0,5 g de carne, sobre una columna C18 Bond Elut (Varian) de 100 mg previamente acondicionada con 1 ml de metanol seguido por 1 ml de tampón Macllvain. Tras el lavado de la columna mediante 1 ml de H₂O y secado de la columna mediante centrifugación durante 5 min. a 4000 g (4°C), se realiza la elución mediante 1 ml de metanol. Tras la evaporación del metanol, se lleva el residuo a 50 µl de tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4, BSA al 0,5%. En este estado, la muestra está lista para la determinación de dosis según el procedimiento descrito anteriormente en el que los 50 µl de muestra extraídos sustituyen a los 50 µl de leche.

60 La figura 5 ilustra a modo de ejemplo la determinación de dosis de cuatro moléculas de tetraciclina diferentes mediante el mismo procedimiento. B0 es la absorbancia obtenida en ausencia de antibiótico y B es la absorbancia obtenida en presencia de antibiótico. La DI50 corresponde a la dosis de antibiótico necesaria para obtener el 50% de saturación del receptor.

Ejemplo 3

5 El ejemplo 3 ilustra la presente invención para la determinación de dosis de las tetraciclinas sin tener que recurrir ni a un marcaje mediante partículas coloreadas, ni a un marcaje enzimático. Es únicamente la presencia del complejo formado la que se detecta. En este ejemplo, el reconocimiento del complejo formado se realiza de manera indirecta con ayuda de la técnica de resonancia de plasmón superficial (tecnología SPR, Biacore A.B., Uppsala, Suecia).

Principio de base

10 En este ejemplo, retomando la nomenclatura de la figura 3, se inmoviliza el fragmento de ADN B (preparado en el punto 1.2.1) sobre el chip Biacore de estreptavidina y se utiliza el receptor A (preparado en el punto 1.1.1) puro sin tener que marcarse. En ausencia de tetraciclina en el medio, se forma el complejo receptor-ADN, lo que impide que el ADN complejado con el receptor se fije al chip. En presencia de tetraciclina, el ADN libre sigue teniendo libertad para fijarse a la estreptavidina y es la fijación del ADN al chip lo que genera el aumento de la señal.

15

Modo operativo y resultado

20 Se acondiciona el chip en el tampón de reacción que está constituido por una disolución de HEPES 75 mM, pH 7,5, NaCl 65 mM, MgCl₂ 15 mM y BSA 1 mg/ml.

20

Una primera disolución indicada como "FC1" de 323,1 µl está constituida por 1,9 µl de ADN preparado como en el punto 1.2.1, 10 µl de TetR 2,1 µM preparado como en el punto 1.1.1 y por 311 µl de tampón de reacción.

25 Una segunda disolución indicada como "FC2" de 323,1 µl está constituida por 1,9 µl de ADN, 10 µl de TetR 2,1 µM, por 4,2 µl de tetraciclina 10 µM y por 307 µl de tampón de reacción.

25

30 Se incuban las disoluciones mencionadas anteriormente 5 min. a temperatura ambiente antes de inyectarse en los dos canales respectivos durante 5 minutos a 10 µl/min. En este experimento, se muestra en la figura 6 que una concentración equivalente a 60 ppb de tetraciclina, presente en la disolución de análisis, no permite la formación del complejo receptor-ADN, liberando el ADN que puede fijarse a la estreptavidina inmovilizada sobre el chip. En el caso de FC1, es decir en ausencia de tetraciclina, el receptor forma un complejo con el ADN, impidiendo que éste se fije a la estreptavidina inmovilizada sobre el chip. Estos resultados son algo inesperados ya que son diferentes de lo que se observa en los ejemplos 1 y 2.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Kit de detección y/o de cuantificación de un antibiótico (C), perteneciente a la familia de las tetraciclinas o de las virginiamicinas, presente en una muestra de análisis, por medio de un receptor (A), estando dicho kit destinado a una puesta en práctica *in vitro*, es decir sin expresarse en ningún sistema biológico o celular, caracterizado porque consiste en los siguientes reactivos:
- 10 - a modo de receptor (A), un represor genético respectivamente de tetraciclina o de virginiamicina, que presenta la propiedad de presentar al menos un primer sitio de reconocimiento específico para el antibiótico (C) y un segundo sitio de reconocimiento específico para una secuencia nucleotídica operadora (B) correspondiente al represor, siendo el segundo sitio distinto del primer sitio, y que presenta la propiedad de que la fijación de dicha secuencia nucleotídica (B) en el receptor (A) en dicho segundo sitio de reconocimiento específico se modula negativamente mediante la fijación del antibiótico (C) en el receptor (A) en dicho primer sitio de reconocimiento específico, es decir que la fijación de dicha secuencia nucleotídica (B) únicamente tiene lugar en ausencia de fijación del antibiótico (C) en el receptor (A);
 - 15 - dicha secuencia nucleotídica (B), monocatenaria o bicatenaria.
- 20 2. Kit según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho represor genético de tetraciclina, respectivamente de virginiamicina, es el represor natural TetR de una de las clases A a G conocidas en las bacterias Gram, o un mutante del mismo, respectivamente el represor natural VarR o un mutante del mismo.
- 25 3. Kit según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la secuencia nucleotídica operadora (B) es un fragmento bicatenario de secuencia específica de las regiones operadoras de los genes tetA y tetR para el reconocimiento de las tetraciclinas o varA y varR para el reconocimiento de las virginiamicinas.
- 30 4. Kit según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho fragmento está situado en el extremo 3' de un elemento constituido por una biotina y por una cadena monocatenaria poli-T.
- 35 5. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la secuencia nucleotídica operadora (B) está inmovilizada, directa o indirectamente, sobre un soporte sólido, estando el receptor (A) eventualmente marcado por al menos una molécula (E, D).
- 40 6. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el receptor (A) está inmovilizado, directa o indirectamente, sobre un soporte sólido, con ayuda de un anticuerpo específico y de una proteína A, estando la secuencia nucleotídica (B) opcionalmente marcada por al menos una molécula (E', D').
- 45 7. Kit según la reivindicación 5, caracterizado porque el receptor (A) está marcado, directa o indirectamente, por medio de un anticuerpo (D) o una biotina (E), pudiendo, dicho anticuerpo (D), respectivamente dicha biotina (E), estar, a su vez, marcado/marcada por medio de una proteína A, respectivamente por una molécula que fija la biotina, realizándose dicho marcaje del receptor (A), del anticuerpo (D) o de la biotina (E) con ayuda de partículas coloreadas, preferentemente partículas de oro coloidales, o con ayuda de una enzima, preferentemente la peroxidasa.
- 50 8. Kit según la reivindicación 6, caracterizado porque la secuencia nucleotídica (B) está marcada, directa o indirectamente, por medio de un anticuerpo (D') o una biotina (E'), pudiendo, a su vez, dicho anticuerpo (D'), respectivamente dicha biotina (E'), estar marcado/marcada por medio de una proteína A, respectivamente por una molécula que fija la biotina, realizándose dicho marcaje de la secuencia nucleotídica (B), del anticuerpo (D') o de la biotina (E') con ayuda de partículas coloreadas, preferentemente partículas de oro coloidales, o con ayuda de una enzima, preferentemente la peroxidasa.
- 55 9. Kit según la reivindicación 5 ó 6, caracterizado porque no se necesita ningún elemento marcado para una detección, pudiendo detectarse la simple presencia o la ausencia del complejo receptor (A) - fragmento nucleotídico (B) mediante un procedimiento fisicoquímico, preferentemente un procedimiento de resonancia de plasmón superficial (SPR) o de espectrometría de masas.
- 60 10. Kit según la reivindicación 5, caracterizado porque el fragmento nucleotídico (B), acoplado a una biotina (E), está asociado a una proteína que fija la biotina, preferentemente la avidina, la estreptavidina, la neutravidina o un anticuerpo anti-biotina, para formar un complejo que se deposita sobre una membrana de nitrocelulosa, definiendo un primer punto de captura para el receptor (A).
11. Kit según la reivindicación 10, caracterizado porque la membrana de nitrocelulosa comprende un segundo punto de captura que puede recuperar, total o parcialmente, el exceso de reactivos que no se fija al primer punto de captura, comprendiendo dicho segundo punto de captura preferentemente gammaglobulina, proteína A o anticuerpo anti-proteína A.

- 5 12. Kit según la reivindicación 11, caracterizado porque, tras la detección, comprende unos medios para cuantificar las señales obtenidas en dichos dos puntos de captura, preferentemente mediante interpretación visual, mediante medición óptica, e incluso preferentemente mediante reflectividad, absorbancia, transmisión, fluorescencia, cámara digital, quimioluminiscencia, mediante resonancia de plasmón superficial o mediante espectrometría de masas.
13. Kit según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos reactivos se acondicionan en un matraz liofilizado y sobre un elemento de tipo tira inmunocromatográfica.
- 10 14. Kit según la reivindicación 13, caracterizado porque está desprovisto de matraz y porque dichos reactivos se asocian directamente en el interior de dicho elemento de tira sobre una membrana próxima a su extremo que puede entrar en contacto con un líquido de análisis.
- 15 15. Kit según la reivindicación 13 ó 14, caracterizado porque dicho elemento de tipo tira inmunocromatográfica está formado por un soporte lineal que comprende una membrana de nitrocelulosa acoplada a un papel absorbente que presenta dos puntos de captura, un primer punto de captura para recuperar total o parcialmente el complejo secuencia nucleotídica (B) - receptor (A) - ligando (C) y un segundo punto de captura para recuperar todo el exceso de reactivos que no se han fijado al primer punto de captura.
- 20 16. Procedimiento de detección y/o de cuantificación de un antibiótico (C), perteneciente a la familia de las tetraciclinas o de las virginiamicinas, presente en una muestra biológica, caracterizado porque:
- se pone en contacto dicha muestra con los reactivos presentes en el kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y porque
- 25 - se detecta la presencia o se mide la concentración de antibiótico (C) presente en dicha muestra mediante inmunocromatografía, mediante determinación enzimática de dosis, preferentemente de tipo ELISA, mediante SPR o mediante espectrometría de masas.
- 30 17. Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque la muestra biológica se pone directamente en presencia de los reactivos sin tener que purificarse previamente.
- 35 18. Procedimiento según la reivindicación 16 ó 17, caracterizado porque la muestra biológica comprende carne, pescado, sangre, suero, líquido fisiológico, orina, lágrimas, saliva, leche, miel, agua, alimentos para ganado u otras preparaciones alimenticias o líquidos de cultivo y de fermentación, o incluso preparaciones o derivados de estas sustancias.

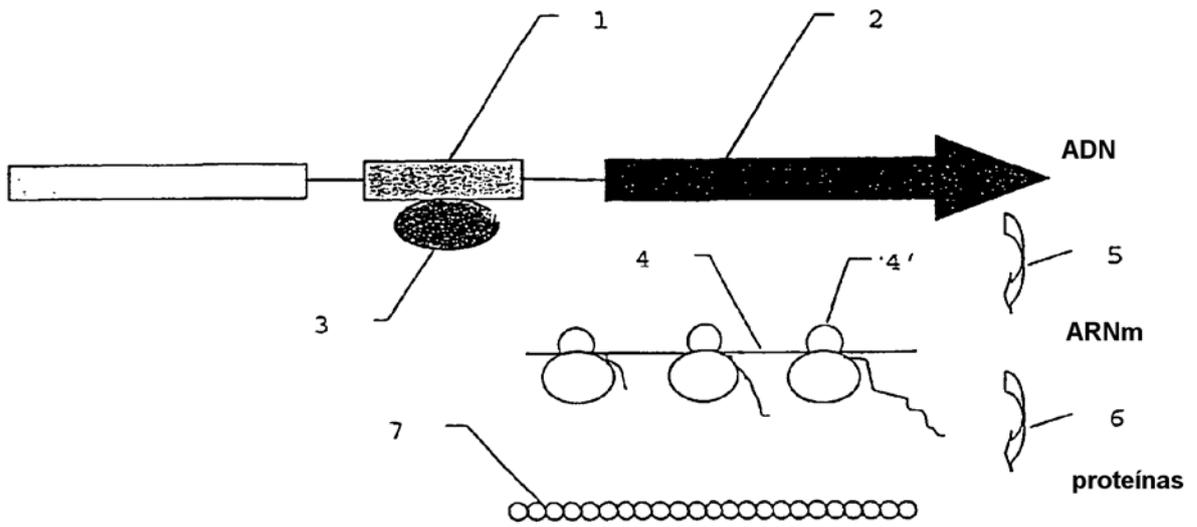


FIG. 1

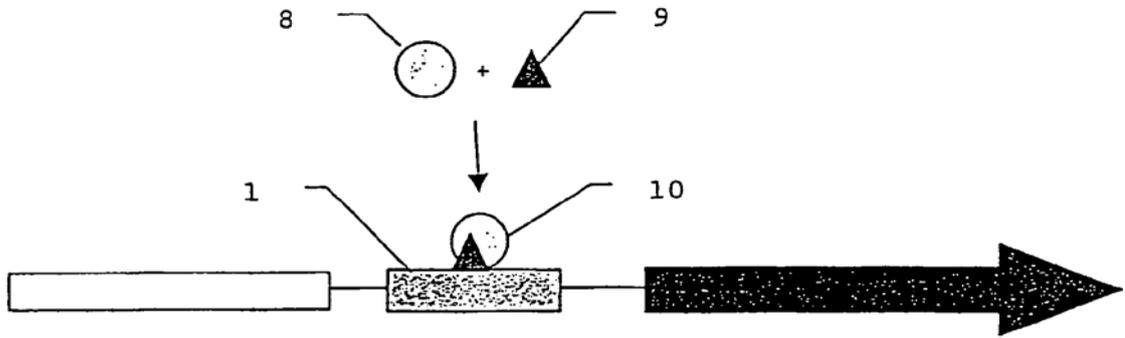


FIG. 2A

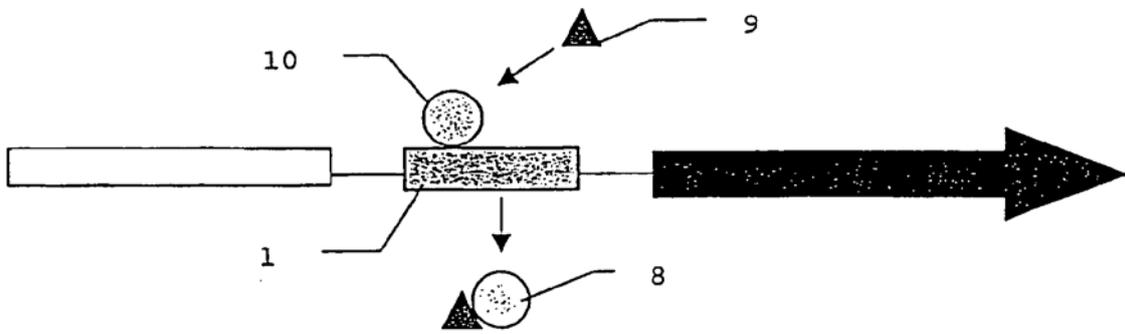


FIG. 2B

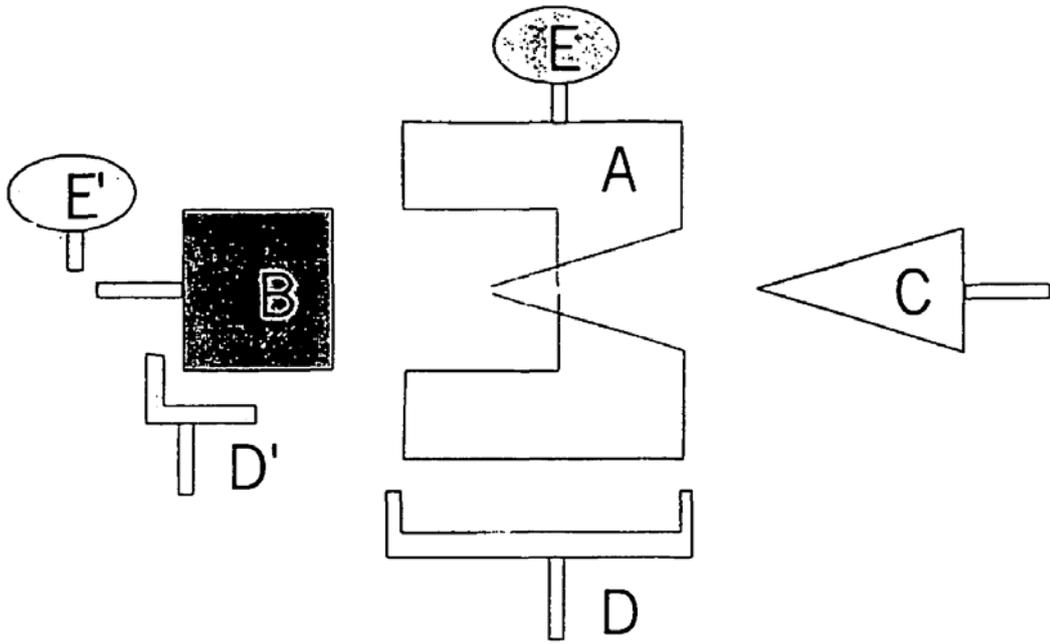


FIG. 3

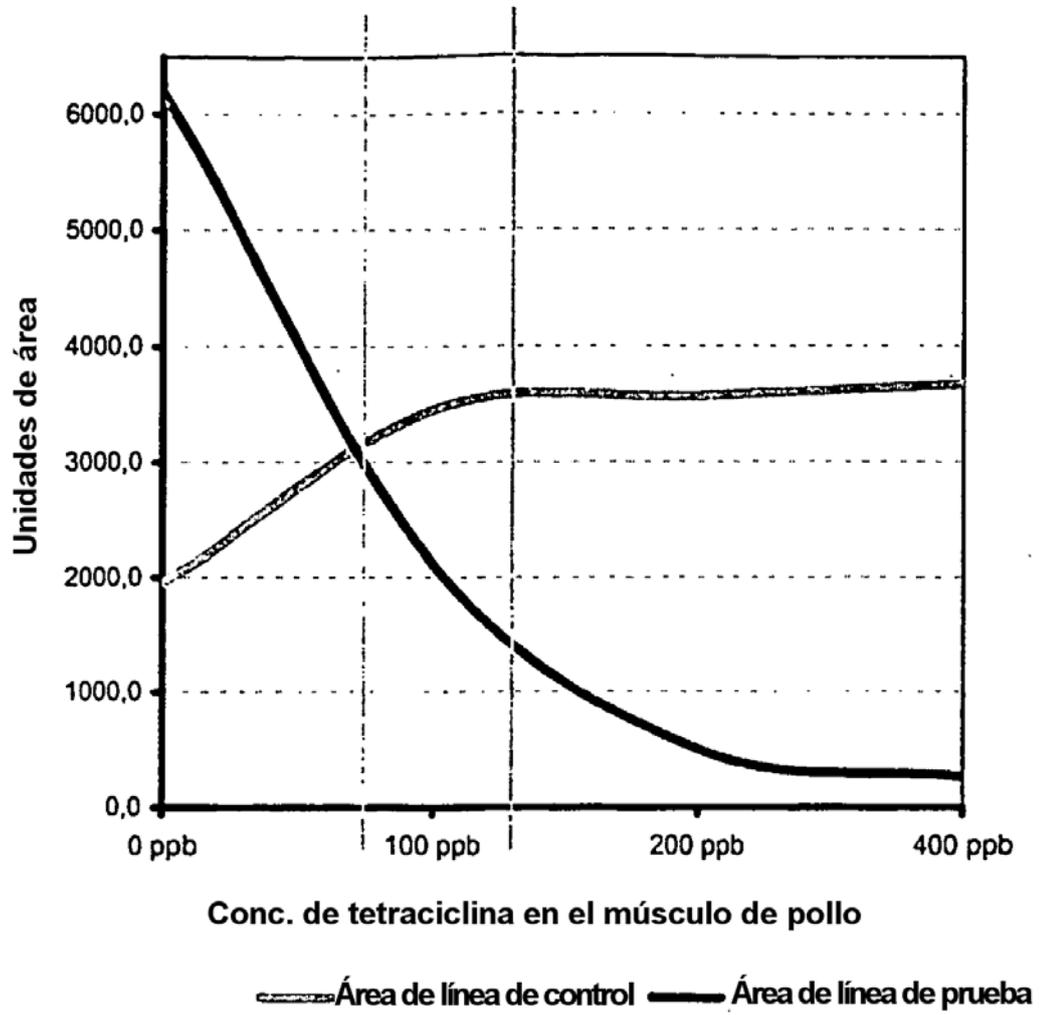


FIG. 4

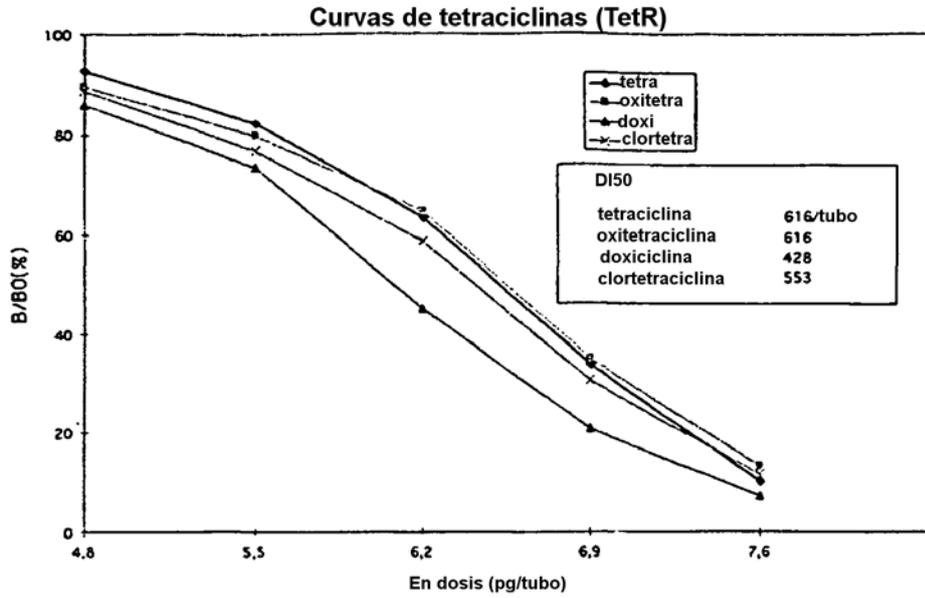


FIG. 5

Fijación del complejo ADN-TetR en presencia de tetraciclina

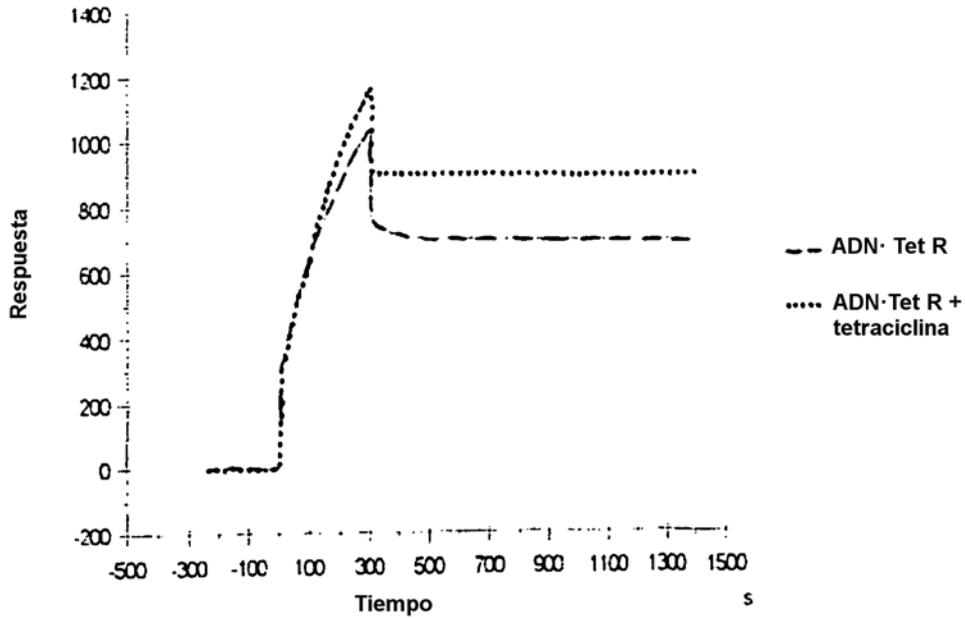


FIG. 6