(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 566 501**

(51) Int. CI.:

G01N 33/94 (2006.01)
C07K 16/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2009 E 09761850 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2297585**

(54) Título: **Detección del consumo de cannabis**

(30) Prioridad:

12.06.2008 FI 20085579

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.04.2016

(73) Titular/es:

TEKNOLOGIAN TUTKIMUSKESKUS VTT OY (100.0%)
Vuorimiehentie 3
02150 Espoo, FI

(72) Inventor/es:

TAKKINEN, KRISTIINA;
SÖDERLUND, HANS y
PULLI, TIMO

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Detección del consumo de cannabis

Campo de la invención

La invención da a conocer medios para mejorar los inmunoensayos para la detección del consumo de cannabis. En particular, la invención se refiere a un asociado de fijación, que es un fragmento de anticuerpo que es capaz de fijarse a un complejo inmunitario entre el tetrahidrocannabinol (THC) y un anticuerpo anti-THC. La invención también se refiere a un kit de detección que comprende el asociado de fijación y el uso de dicho asociado de fijación para detectar el consumo de cannabis. La invención se refiere adicionalmente a un inmunoensayo en el que se utiliza dicho asociado de fijación. Aún más, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica dicho asociado de fijación y a una célula hospedadora capaz de expresarlo.

Antecedentes técnicos de la invención

La toxicomanía es una amenaza grave, en especial para la seguridad del tráfico y, por lo tanto, se han desarrollado numerosos ensayos para detectar ventajosamente las drogas. Muchas de las pruebas son inmunoensayos y son principalmente inmunoensayos competitivos que por lo general son menos específicos que los acompetitivos. Kerrigan y Phillips, p. ej., han comparado 12 ELISA (inmunoensayos enzimáticos) disponibles en el mercado para los opiatos, metanfentamina, benzodiazepinas, metabolito de cocaína, fenciclidina y cannabinoides en la sangre completa y en la orina (Kerrigan S., y Phillips, W., 2001 *Clinical Chemistry* 47 (3): 540-547). El formato de la prueba era el inmunoensayo competitivo y los resultados no eran totalmente satisfactorios porque se obtenían algunos resultados falsos y había reactividad cruzada indeseada.

Las drogas se pueden analizar no sólo a partir de la sangre o de la orina, sino también de la saliva, que es la matriz problema de elección para los controles de carretera. Lo Muzio et al. analizaron una prueba rápida comercial por cribado inmunitario para detectar drogas en la orina, y compararon dos matrices biológicas: una no convencional, la saliva, y una tradicional, la orina. Encontraron que las muestras de saliva daban negativo en las pruebas inmunitarias para cannabis, THC, benzodiazepinas y antidepresivos tricíclicos, aunque el análisis por espectrometría de masas y cromatografía de gases (EM-CG) reveló que estaban poco concentrados, con lo que concluyeron que había que mejorar el kit de detección antes de utilizarlo con la saliva (Lo Muzio L., et al., 2005. *Int. J. Immunopathol Pharmacol*. 18(3): 567-573).

En la solicitud de patente internacional WO 2004/046733 se describe un inmunoensayo acompetitivo para ensayar analitos pequeños, tales como las drogas. Para mejorar la sensibilidad y la especificidad de un ensayo, en el ensayo se utiliza un primer anticuerpo específico contra el analito y un segundo anticuerpo específico contra un complejo inmunitario (CI) entre el primer anticuerpo y el analito. El anticuerpo anti-CI utilizado se obtuvo de una genoteca de fragmentos de anticuerpo indiferenciado de humano para exposición en fagos mediante la preincubación de los fagos expositores con el primer anticuerpo fijado para clasificar los que se fijan al primer anticuerpo como tales, para después separar los fagos sin fijar e incubarlos con una mezcla de analito y del primer anticuerpo inmovilizado para seleccionar los fagos que se fijan al complejo inmunitario formado entre el primer anticuerpo inmovilizado y el analito, pero no al anticuerpo como tal. Se obtuvieron unos resultados muy buenos para determinar la morfina en la saliva.

El Δ9-tetrahidrocannabinol (Δ9-THC) es una droga precursora del cannabis y se metaboliza rápidamente a 11-nor-Δ9-THC-COOH o 11-OH-Δ9-THC, que se pueden determinar en la orina. Así pues, el consumo de cannabis se detecta preferiblemente mediante el ensayo del Δ9-THC en la saliva, lo que es una mejor indicación del consumo reciente que cuando se detectan los metabolitos en la orina. Sin embargo, resultó difícil el desarrollo de una prueba rápida para detectar este analito, y los kits de detección del mercado no son suficientemente sensibles.

En la patente de los EE. UU. US 6.326.159 y en Ullman et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 90: 1184-1189 se describe un inmunoensayo que utiliza anticuerpos anti-CI para reforzar la afinidad y la especificidad de los anticuerpos primarios. En estos artículos se ha desarrollado un anticuerpo secundario anti-CI que se fija al anticuerpo primario contra el analito que está combinado con el analito, pero que no se fija al anticuerpo primario ni al analito por separado. Se describe un anticuerpo que reconoce un complejo inmunitario de un anticuerpo contra el tetrahidrocannabinol (THC). El anticuerpo anti-CI se obtuvo con un anticuerpo anti-THC marcado por afinidad a modo de inmunógeno y la posterior selección de un anticuerpo anti-CI cuya fijación se viera reforzada por la presencia del Δ9THC. Se observó cierta reactividad cruzada con, p. ej., los metabolitos del THC, lo que no resulta deseable en los análisis forenses de drogas. Los anticuerpos se prepararon mediante la técnica de hibridomas convencional, que los vuelve demasiado grandes para ser utilizados en los inmunoensayos homogéneos.

Kintz P. et al. analizaron un dispositivo comercial para las pruebas de detección de drogas en la saliva y compararon los resultados con los resultados del análisis por EM-CG, y encontraron que el dispositivo de detección identificaba la exposición al THC en solo un conductor, mientras que 18 conductores dieron positivo con la EM-CG. Concluyeron que una limitación actual del uso de esta muestra para los controles de carretera es la ausencia de un inmunoensayo idóneo para detectar el compuesto precursor (THC) en concentraciones suficientemente bajas (Kintz

P. et al., 2005. *J. Anal. Toxicol*. 29 (7): 724-727).

Los inmunoensayos actuales para determinar el consumo de cannabis no son satisfactorios, entre otras cosas debido a las bajas especificidad y sensibilidad. Así pues, todavía se sigue necesitando una prueba fácil, rápida y fiable para la detección del consumo de cannabis que se pueda utilizar, p. ej., en los controles de carretera y, preferiblemente, que analice muestras de líquido oral, que no sea invasiva, que sea fácil de realizar, y que se pueda obtener en estrecha supervisión. La presente invención satisface al menos algunas de estas necesidades.

Compendio de la invención

La presente invención da a conocer un nuevo reactivo que facilita la detección rápida y fiable del consumo de cannabis. El reactivo es una proteína capaz de reconocer de forma específica un complejo inmunitario formado entre el cannabinoide y el anticannabinoide. Más específicamente, la presente invención da a conocer un asociado de fijación, que es un fragmento de anticuerpo que reconoce de forma específica un complejo inmunitario entre el tetrahidrocannabinol (THC) y el anti-THC, y que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR, por su nombre en inglés) de una cadena ligera y una cadena pesada de anticuerpo, en donde dichas regiones de la cadena ligera tienen las secuencias aminoacídicas de los aminoácidos 23 a 35, 51 a 57 y 93 a 100 de la SEQ ID n.º 3, y dichas regiones de la cadena pesada tienen las secuencias aminoacídicas de los aminoácidos 29 a 35, 50 a 60 y 99 a 109 de la SEQ ID n.º 4.

La invención da a conocer además un kit de detección que comprende el fragmento de anticuerpo mencionado más arriba y otro fragmento de anticuerpo que se fija de forma específica al THC, y que comprende las secuencias aminoacídicas de SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 2, y el uso de dichos dos fragmentos de anticuerpo para detectar el THC en una muestra de líquido corporal tomada de una persona a analizar por haber consumido cannabis. Debido a las altas especificidad y sensibilidad, y al tamaño preferiblemente pequeño, el asociado de fijación es especialmente idóneo para un inmunoensayo homogéneo acompetitivo que se puede utilizar, p. ej., en los controles de carretera para analizar la saliva de los conductores que se sospecha que han consumido cannabis.

Aún más, la invención da a conocer un inmunoensayo para detectar un analito en una muestra de líquido corporal tomada de una persona, mediante lo cual la muestra se hace reaccionar con una pareja de reactivos que comprende un primer fragmento de anticuerpo que se fija de forma específica al analito y un segundo fragmento de anticuerpo que se fija de forma específica al complejo que forman el analito y el primer fragmento de anticuerpo, y determinar la fijación del segundo fragmento de anticuerpo a dicho complejo, lo que así indica la presencia del analito en la muestra, en donde dicho analito es el THC y dicho primer fragmento de anticuerpo que se fija de forma específica al THC comprende las secuencias aminoacídicas de SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 2, y dicho segundo fragmento de anticuerpo comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una cadena ligera y una cadena pesada de anticuerpo, en donde dichas regiones de la cadena ligera tienen las secuencias aminoacídicas de los aminoácidos 23 a 35, 51 a 57 y 93 a 100 de la SEQ ID n.º 3, y dichas regiones de la cadena pesada tienen las secuencias aminoacídicas de los aminoácidos 29 a 35, 50 a 60 y 99 a 109 de la SEQ ID n.º 4.

Y además, la invención da a conocer un polinucleótido que codifica el fragmento de anticuerpo, y una célula hospedadora capaz de expresar el fragmento de anticuerpo de la invención. El polinucleótido es ADN o ARN.

En las reivindicaciones que se adjuntan al final se presentan realizaciones ventajosas de la invención.

Breve descripción de los dibujos

En la figura 1 se muestran las secuencias aminoacídicas de la cadena ligera del Fab T3 contra el THC (SEQ ID n.º 1) y la cadena pesada VH-CH1 del Fab T3 contra el THC (SEQ ID n.º 2). Se indican las tres regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de cada una de dichas cadenas de inmunoglobulina.

En la figura 2 se muestran las secuencias aminoacídicas de la cadena ligera del Fab 104 contra el complejo inmunitario T3+THC (SEQ ID n.º 3) y de la cadena pesada del Fab 104 contra el complejo inmunitario T3+THC (SEQ ID n.º 4). Se indican las tres regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de cada unas de dichas cadenas de inmunoglobulina.

En la figura 3 se muestran los resultados de la prueba del THC por TR-FRET obtenidos con la combinación del Fab T3 contra el THC y del Fab 104 contra el complejo inmunitario T3+THC para diferentes drogas y metabolitos de las drogas.

Descripción detallada

Cannabinoide es el nombre general de las moléculas terpenfenólicas halladas en las plantas del cáñamo *Cannabis sativa*. De forma más general, abarca un grupo de moléculas que están relacionadas desde el punto de vista estructural con el tetrahidrocannabinol (THC) y que se fijan al receptor de cannabinoides. El THC es el principal cannabinoide psicoactivo del cannabis y es sinónimo del Δ9-tetrahidrocannabinol (Δ9-THC) y del D9-tetrahidrocannabinol (D9-THC), que se pueden utilizar indistintamente en la presente memoria. El THC se

metaboliza en el cuerpo y pasa a, entre otras cosas, 11-nor-D9-THC-COOH y 11-OH-D9-THC, que son ejemplos de otros cannabinoides. El asociado de fijación de la invención reconoce de forma específica un complejo inmunitario entre el THC y el anti-THC, lo que hace que la reacción con los metabolitos sea significativamente más baja.

El asociado de fijación de la invención se puede utilizar en un ensayo en sándwich para detectar el THC en una muestra, mediante lo cual la muestra se hace reaccionar con una pareja de reactivos que comprende un primer asociado de fijación que se fija de forma específica al THC y un segundo asociado de fijación que es capaz de reconocer de forma específica un complejo inmunitario entre el THC y el anti-THC, y que es el asociado de fijación de la invención. La fijación del segundo asociado de fijación al complejo inmunitario entre el primer asociado de fijación y el THC indica la presencia de THC en la muestra.

«Asociado de fijación», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a fragmentos de anticuerpo que tienen las propiedades de fijación deseadas. Un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina y puede pertenecer a cualquiera de las clases de IgG, IgM, IgE, IgA o IgD; IgG e IgM son las que se utilizan con más frecuencia. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo comprenden el sitio de fijación al ligando, tal como los fragmentos Fab o scFv. El fragmento conocido como el fragmento Fab (fragmento de fijación al antígeno) consiste en el dominio variable y constante de una cadena ligera de inmunoglobulina unido covalentemente por un puente disulfuro al dominio variable y al primero constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Fv (dominio variable) hace referencia a las regiones variables de la molécula de inmunoglobulina que son responsables de la fijación al ligando. ScFv (Fv monocatenario) se refiere a una molécula en la que los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo están conectados mediante un péptido para formar una única cadena polipeptídica que se sintetiza a partir de una única molécula del ARNm. Las regiones variables de una cadena pesada y una cadena ligera de inmunoglobulina son en conjunto las responsables de la fijación al ligando. El ligando es la sustancia a la cual se fija el asociado de fijación que es, con respecto a los anticuerpos, un antígeno o un hapteno.

Los asociados de fijación se preparan ventajosamente mediante el uso de una genoteca recombinante de asociados de fijación para exposición en fagos, p. ej., como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2004/046733. Cuando se ha seleccionado el primer asociado de fijación, forma un complejo con su ligando y este complejo se utiliza para seleccionar el segundo asociado de fijación dentro de una genoteca recombinante. El primer asociado de fijación sin el ligando se utiliza como contraselección. El segundo asociado de fijación sólo debe reconocer complejos, y no debe reconocer de manera significativa en absoluto ni al primer asociado de fijación libre ni al antígeno libre.

Se puede construir una genoteca de anticuerpos para exposición en fagos mediante la clonación de ADNc que codifican dominios de inmunoglobulinas en un vector adecuado para la exposición en fagos. El ADN que codifica millones de variantes de fragmentos de anticuerpos se clona por lotes en el vector como parte de la proteína de la cápsida de los fagos. Mediante la transformación de las bacterias con los vectores se pueden obtener genotecas grandes que contienen millones de fragmentos de anticuerpo con diferente especificidad. El cultivo de las bacterias conduce a la expresión de fagos que exponen los fragmentos de anticuerpo en su superficie. El genoma del fago porta el gen del anticuerpo expuesto, con lo que se conecta el genotipo con el fenotipo. La conexión física entre la proteína expuesta y su ADN permite cribar una gran cantidad de variantes de la proteína, cada una conectada a su correspondiente ADN, mediante un procedimiento de selección *in vitro* sencillo denominado rondas de cribado. En su forma más simple, las rondas de cribado se llevan a cabo mediante la incubación del conjunto de variantes expuestas en los fagos con el ligando de interés que se ha inmovilizado en un vehículo, el lavado para retirar el fago sin fijar y la elución específica del fago fijado mediante la desestabilización de su fijación al ligando. A continuación, el fago eluido se amplifica *in vivo*. El procedimiento se repite varias veces, lo que da lugar a un enriquecimiento paulatino del conjunto de fagos a favor de las secuencias con las que se fijan con más fuerza. Después de unas 3 a 6 rondas de selección y amplificación, se secuencian los mejores clones y se transforman en una célula hospedadora para su posterior expresión. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota o procariota, p. ej., una célula de levadura, de animal, de planta o de insecto, o una célula bacteriana. Puede ser incluso una célula de hibridoma, que después de la transformación produce un anticuerpo monoclonal recombinante. El asociado de fijación recombinante, o al menos parte de él, también se puede producir de forma sintética.

La pareja de reactivos que comprende un primer asociado de fijación que reconoce el THC y un segundo asociado de fijación que reconoce un complejo inmunitario entre el THC y dicho primer asociado de fijación permite la realización de un ensayo acompetitivo en sándwich para el THC. El sándwich se puede detectar con todos los inmunoensayos estándares. Se puede inmovilizar un asociado en un vehículo, tal como un pocillo de microtitulación o una perla. Se forma un sándwich en presencia del analito y el otro asociado de fijación. El sándwich se puede detectar, p. ej., con el uso de anticuerpos secundarios o mediante la marcación de al menos uno de los asociados de fijación. La marcación puede ser cualquier marcación convencional, tal como una marcación radioactiva, una enzima o un compuesto fluorescente. El ensayo puede ser, p. ej., ELISA o FIA.

Una gran ventaja de la pareja de reactivos que comprende el asociado de fijación de la presente invención es que permite realizar un inmunoensayo homogéneo, a saber, un inmunoensayo que se lleva a cabo en solución. Al evitar las etapas de inmovilización y lavado, el ensayo se vuelve muy sencillo. El ensayo homogéneo proporciona una

herramienta excelente y ventajosa para los controles de carretera, p. ej., lo puede utilizar la policía en las campañas de control antidopaje de los conductores, etc. El inmunoensayo dado a conocer en la invención es hasta diez veces más sensible que los ensayos competitivos que hoy en día se venden en el mercado. La muestra a analizar es una muestra de líquido corporal, tal como sangre, suero u orina, pero es preferiblemente un líquido oral, tal como la saliva. En analito es el THC.

Un inmunoensayo homogéneo preferido es uno basado en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), para una revisión véase Szöllösi J. et al., 1998, *Communications in Clinical Cytometry*, 34; 159-179. En la FRET, la energía de un fluoróforo molecular (donante) se excita a un estado de alta energía y se transfiere a otro fluoróforo (aceptor) a través del acoplamiento intermolecular entre dipolos. Esto es posible sólo si la distancia entre el donante y el aceptor es pequeña (de 10 a 100 Å) y el espectro de fluorescencia del donante y el espectro de absorción del aceptor se solapan parcialmente. La transferencia de energía se detecta a continuación como un cambio de fluorescencia. A menudo se utiliza la fluorescencia resuelta en el tiempo (Hemmilä I. et al., 1988, *Clin*. *Chem*. 34: 2320-2322).

La FRET se puede aplicar en la presente invención al marcar los dos asociados de fijación, que son fragmentos de anticuerpo, con fluoróforos que forman una pareja donante-aceptor para la FRET. Cuando los asociados de fijación y el analito son pequeños, los fluoróforos quedan muy cerca y se obtiene una señal de FRET medible.

Como alternativa, el inmunoensayo para el consumo de cannabis puede ser, por ejemplo, una prueba convencional en sándwich en pocillos de microtitulación o una prueba de flujo lateral.

El fragmento de anticuerpo de la invención se puede incluir en un kit de detección, que puede contener además cualquier otro reactivo necesario para el ensayo, junto con las instrucciones del uso. El kit de detección de la invención contiene también un primer fragmento de anticuerpo, que comprende las secuencias aminoacídicas de SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 2 para la fijación del THC. Preferiblemente, el kit de detección comprende reactivos para realizar un ensayo homogéneo acompetitivo, tal como, p. ej, los reactivos necesarios para una prueba por TR-FRET. El kit puede comprender además soluciones de reacción, tampones, soluciones de lavado y medios de detección, tales como marcadores y, facultativamente, un fluorímetro.

La prueba se puede poner en funcionamiento de tal manera que los reactivos están en el pocillo de una placa de microtitulación y se les añaden las diluciones seriadas de la muestra. En un modo preferido para, p. ej., ser usado en el ámbito policial, los reactivos están en forma seca en un recipiente. Se le añade la saliva, que disuelve los reactivos, y el resultado se puede leer sin más procedimientos.

Preferiblemente, el kit de detección comprende reactivos para analizar varias drogas, tales como los reactivos para analizar, p. ej., morfina, codeína, heroína, anfetamina, metanfetamina, cocaína, barbituratos y benzodiazepinas. En ese caso, el kit de detección puede comprender muchas parejas de reactivos separados de forma física los unos de los otros, p. ej., en forma de una micromatriz, gracias a lo cual se pueden analizar a la vez muchas drogas a partir de una única muestra de saliva.

El fragmento de anticuerpo de la invención comprende tres CDR de una cadena ligera de anticuerpo que tiene la secuencia de SEQ ID n.º 3, y tres CDR de una cadena pesada de anticuerpo que tiene la secuencia de SEQ ID n.º 4. De acuerdo con una realización de la invención, el asociado de fijación comprende toda la región variable, a saber, la porción de fijación al ligando de dichas cadena ligera (VL) y cadena pesada (VH). Así pues, puede contener los aminoácidos 1 a 111 de la SEQ ID n.º 3 y los aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID n.º 4. En particular, dicho asociado de fijación comprende las secuencias aminoacídicas de las SEQ ID n.º 3 y n.º 4.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Desarrollo del Fab anti-THC

Se inmunizaron los ratones con SAB (Fitzgerald) conjugada al THC en el adyuvante de Freund y las muestras de suero se analizaron después de una segunda inyección de refuerzo, y el ratón que mostró en el ELISA directo la mejor respuesta contra el antígeno se seleccionó para ser la fuente de una genoteca de anticuerpos para la exposición en fagos. Se construyó una genoteca de fragmentos de anticuerpo para exposición en fagos, se enriqueció en los fagos específicos del THC y el fragmento génico Fab de cada uno de los clones se aisló, se expresó y se caracterizó tal como está descrito en la solicitud de patente internacional WO 2004/046733. Se eligió el Fab T3 anti-THC para los ensayos posteriores.

La secuencia aminoacídica de la cadena ligera del Fab T3 anti-THC se presenta como la SEQ ID n.º 1 y la cadena VH-CH1 del Fab T3 anti-THC se presenta como la SEQ ID n.º 2. Las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del Fab corresponden a los aminoácidos 24 a 35, 51 a 57 y 90 a 98 de la SEQ ID n.º 1. Las CDR1, CDR2 y CDR3 de la

cadena pesada del Fab corresponden a los aminoácidos 27 a 36, 51 a 66 y 99 a 107 de la SEQ ID n.º 2. Los aminoácidos de n.º 1 a 108 de la SEQ ID n.º 1 representan la región variable de la cadena ligera, y los aminoácidos de n.º 1 a 118 de la SEQ ID n.º 2 representan la región variable de la cadena pesada. Los aminoácidos de n.º 109 a 215 de la SEQ ID n.º 1 representan la región constante de la cadena ligera κ de ratón, y los aminoácidos n.º 119 a 221 de la SEQ ID n.º 2 representan la región CH_1 constante de ratón de la cadena pesada. Las secuencias aminoacídicas del Fab T3 anti-THC también se muestran en la figura 1.

Ejemplo 2

Desarrollo de un anticuerpo anti-CI contra el complejo inmunitario formado por el Fab anti-THC y el THC

Selección del anticuerpo específico contra el complejo inmunitario a partir de una genoteca de scFv indiferenciado de humano para la exposición en fagos

El fragmento Fab T3 se biotiniló con el kit ImmunoPure Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce). Se purificó el anticuerpo biotinilado y el tampón se le cambió a PBS con columnas Econo-Pac 10DG (Bio-Rad, CA, EE. UU.). Se preincubaron 200 µl de una genoteca de scFv indiferenciado de humano para la exposición en fagos (cadena ligera κ o λ) en SAB/PBS con 10 µl de perlas magnéticas revestidas con estreptavidina (Dynal, M-280) y 0,5 µg del Fab T3 biotinilado durante una noche a +4 ºC. La genoteca de scFv indiferenciado de humano para la exposición en fagos se construyó a partir del conjunto de linfocitos de 50 individuos sanos. El tamaño de la genoteca se estimó que sería de 1×10^8 clones. La genoteca de scFv indiferenciado de humano para la exposición en fagos contiene los genes de V_H específicos de IgM combinados con los genes de V_L específicos de κ o bien de λ. Los fagos sin fijar se separaron de las perlas y se incubaron 100 µl de ellos con 100 ng de THC, 500 ng del Fab T3 biotinilado y 5 µl de perlas magnéticas revestidas con estreptavidina durante 1 h a TA en un agitador. El ruido de fondo para el procedimiento de selección se aplicó de un modo parecido, pero omitiendo el THC de la reacción de fijación. Las perlas magnéticas se lavaron cinco veces con 0,5 ml de PBS y los fagos fijados se eluyeron con 100 µl de HCl (pH 2,2) durante 30 min. Los fagos eluidos se neutralizaron con Tris a 1 M y con ellos se infectaron las células XL1-Blue de *E. coli*. Se hicieron crecer las células y se purificaron los fagos tal y como está descrito en la solicitud de patente internacional WO 2004/046733. Después de tres rondas de cribado, se observó el enriquecimiento al comparar la cantidad de fagos eluidos con la cantidad de fagos eluidos del pocillo de control del ruido de fondo. El enriquecimiento en moléculas que se fijan específicamente al complejo inmunitario formado por el Fab T3 y el THC también se observó con claridad en un ELISA de fagos cuando se analizaron los conjuntos de fagos eluidos de las rondas de selección y se analizaron los clones fágicos de cada uno de los scFv.

Caracterización de los clones por separado

Se cogió cada uno de los clones fágicos de scFv que se fijan específicamente al complejo T3+THC, se secuenció, se expresó y se analizó. El clon 104 se eligió para una evaluación posterior. Ya que los scFv son propensos a la agregación durante la expresión y la purificación, el clon 104 específico contra el complejo inmunitario se convirtió a un fragmento Fab mediante la clonación de las regiones génicas de la cadena ligera λ de humano y las regiones constantes CH1 de IgG1 en los genes de V_L y de V_H, respectivamente. En el extremo carboxilo de CH1 se insertó una etiqueta para extremo carboxilo que contiene seis restos de histidina con el objeto de purificarlo por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC, por su nombre en inglés). El fragmento Fab 104 se clonó en el vector de expresión pKKtac y se verificó la secuencia. La secuencia aminoacídica de la cadena ligera del Fab 104 contra el complejo inmunitario T3+THC se presenta como la SEQ ID n.º 3 y la región VH-CH1-6His-Tag del Fab como la SEQ ID n.º 4. Los aminoácidos de n.º 1 a 111 de la SEQ ID n.º 3 representan la región variable de la cadena ligera y los aminoácidos de n.º 1 a 120 de la SEQ ID n.º 4 representan la región variable de la cadena pesada. Los aminoácidos de n.º 112 a 216 de la SEQ ID n.º 3 representan la región constante de la cadena ligera λ de humano y los aminoácidos de n.º 121 a 223 de la SEQ ID n.º 4 representan la región constante de la región CH_1 de la cadena pesada de humano. Los seis restos de histidina del extremo carboxilo de la región constante de la cadena pesada facilitan la purificación del fragmento Fab mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC).

Expresión y purificación del Fab 104

El vector de expresión del fragmento Fab 104 se transformó en la cepa de producción RV308 de *E. coli*. Las células se inocularon en 25 ml de medio TB (12 g/l de extracto de levadura, 24 g/l de peptona de soja, 2,31 g/l de KH_2PO_4, 12,54 g/l de K_2HPO_4, 5 g/l de glicerol, pH 7,1) con ampicilina a 100 µg/ml y glucosa al 2%, y se incubaron durante una noche a +37 ºC en un agitador. Del cultivo de una noche se tomó un inóculo de 6 ml y se añadió a dos matraces Erlenmeyer que contenían 300 ml de TB con 100 µg/mol de ampicilina. Las células se incubaron a +37 ºC en un agitador hasta que la DO_{600} fue de 4, tras lo cual se le añadieron al cultivo 0,3 ml de IPTG a 1 M y 100 µg/ml de ampicilina y se dejó que la incubación continuara durante una noche a +30 ºC en un agitador. El sobrenadante del medio de cultivo se utilizó para la purificación del fragmento Fab 104. Las células se centrifugaron a 4.000*g* durante 20 min a 4 ºC y el sobrenadante se vertió en un frasco limpio. El sobrenadante se trató con 2 mg/ml de ADNasa I para retirar el ADN cromosómico residual durante una hora a +37 ºC. Ya que el Fab 104 expresado tiene una etiqueta 6×His en su extremo carboxilo, se pudo purificar mediante cromatografía de afinidad con metales

inmovilizados (IMAC). El Fab 104 se purificó mediante Sepharose quelante con Ni^{2+} (Amersham Pharmacia Biotech). La pureza del Fab 104 se comprobó por SDS-PAGE.

Ejemplo 3

Un inmunoensayo homogéneo para el THC por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET, por su nombre en inglés)

El fragmento Fab T3 anti-THC se marcó con europio mediante el kit LANCE Eu-W1024 ITC chelate (Wallac). El tampón del T3 marcado se cambió a Tris a 50 mM, pH 7,8, y NaCl al 0,9%. El fragmento Fab 104 contra el complejo inmunitario T3+THC se marcó con Alexa Fluor 647 con el kit de marcación de proteínas con Alexa Fluor (Molecular Probes, Inc.).

A los pocillos de microtitulación con 60 µl de saliva se les añadieron 1 µg del Fab T3 anti-THC marcado con Eu y 1,5 µg del Fab 104 contra el complejo inmunitario marcado con Alexa Fluor 647. A los pocillos se les añadieron muestras de 40 µl de saliva enriquecida con 0, 3,75, 7,5, 15, 30, 60 y 120 ng/ml de las siguientes drogas: D9-THC, 11-OH-D9-THC, 11-nor-D9-THC-COOH, heroína y anfetamina. Después de una mezcla breve, se midió la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET) con un fluorímetro Victor V (Perkin Elmer Wallac). Los resultados se muestran en la figura 3.

La muestra de saliva enriquecida con THC da un valor fluorescente alto, mientras que los metabolitos del THC dan valores de fluorescencia significativamente más bajos, y la heroína y la morfina dan valores de fluorescencia cercanos a la fluorescencia de fondo detectada en el control (fragmentos T3 y 104 marcados a lo que no se ha añadido ninguna droga). El Fab 104 se fija al complejo inmunitario formado entre el T3 y el THC con una especificidad y sensibilidad extremadamente altas. La prueba es capaz de detectar el THC muy por debajo del nivel de umbral (20 ng/ml en la saliva) de las pruebas rápidas que actualmente están disponibles en el mercado.

LISTA DESECUENCIAS

<110> Valtion teknillinen tutkimuskeskus

<120> Detección del consumo de cannabis

<130> 2080700PC

<160> 4

<170> Patentin versión 3.3

<210> 1

<211> 215

<212> PRT

<213> Murinae gen. sp.

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..C108)

<223> VL

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (24)..(35)

<223> CDRI

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (51)..(57)

<223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (90)..(98)

<223> CDR3

<220>

<221> DOMINIO

<222> (109)..(215)

<223> CL

<400> 1

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala
100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
115 120 125

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 2

<211> 221

<212> PRT

<213> Murinae gen. sp.

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(118)

<223> VH

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (27)..(36)

<223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (51)..(66)

<223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (99)..(107)

<223> CDR3

<220>

<221> DOMINIO

<222> (119)..(221)

<223> CH

<400> 2

```
Ala Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
1               5                  10                  15
```

```
Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn
            20                  25                  30

Tyr Val Met Val Trp Leu Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Val Ala Ser Ile Ser Arg Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Asn
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Val Arg Gly Thr Thr Ile Val Ala Gly Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
            100                 105                 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
            180                 185                 190

Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
        195                 200                 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
    210                 215                 220
```

<210> 3

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(111)

<223> VL

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (23)..(35)

<223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (51)..(57)

<22B> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (93)..(100)

<223> CDR3

<220>
<221> DOMINIO
<222> (112)..(216)
<223> CL

<400> 3

```
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1               5                  10                  15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn
            20                  25                  30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val
        35                  40                  45

Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65                  70                  75                  80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
                85                  90                  95

Ser Asn Gln Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
            100                 105                 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
        115                 120                 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145                 150                 155                 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
                165                 170                 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
            180                 185                 190

Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
```

195 200 205

Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
210 215

<210> 4

<211> 229

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(120)

<223> VH

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (29),.(35)

<223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (50)..(60)

<223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (99)..(109)

<223> CDR3

<220>

<221> DOMINIO

<222> (121)..(223)

<223> CH

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (224)..(229)
<223> Marcador 6His
<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Phe Ser Gly Asp Asn Phe Ile Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Leu Val Asp Leu Gly Asp Gly Gln Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

His Gly Arg Gly Thr Ile Thr Ala Asp Ser Ser Arg Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Lys Ala Tyr Arg Gln Gly Val Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys His
210 215 220

His His His His His
225

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de anticuerpo que reconoce específicamente un complejo inmunitario entre el tetrahidrocannabinol (THC) y el anti-THC, y que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una cadena ligera y de una cadena pesada de anticuerpo, en donde dichas regiones de la cadena ligera tienen las secuencias aminoacídicas de los aminoácidos 23 a 35, 51 a 57 y 93 a 100 de la SEQ ID n.º 3 y dichas regiones de la cadena pesada tienen las secuencias aminoacídicas de los aminoácidos 29 a 35, 50 a 60 y 99 a 109 de la SEQ ID n.º 4.

2. El fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende los aminoácidos 1 a 111 de la SEQ ID n.º 3 y los aminoácidos 1 a 120 de la SEQ ID n.º 4.

3. El fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el fragmento comprende las secuencias aminoacídicas de SEQ ID n.º 3 y SEQ ID n.º 4.

4. Un kit de detección que comprende el fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y otro fragmento de anticuerpo que se fija de forma específica al THC y que comprende las secuencias aminoacídicas de SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 2.

5. El kit de detección de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende los reactivos para un inmunoensayo homogéneo acompetitivo.

6. El kit de detección de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende los reactivos para la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET).

7. El kit de detección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende los reactivos para analizar muchas drogas.

8. Utilización del fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 junto con un fragmento de anticuerpo que se fija de forma específica al THC y que comprende las secuencias aminoacídicas de SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 2, para la detección del THC en una muestra de líquido corporal tomada de una persona a analizar por haber consumido cannabis.

9. Un inmunoensayo para detectar un analito en una muestra de líquido corporal tomada de una persona, gracias a lo cual la muestra se hace reaccionar con una pareja de reactivos que comprende un primer fragmento de anticuerpo que se fija de forma específica al analito y un segundo fragmento de anticuerpo que se fija de forma específica al complejo formado por el analito y el primer fragmento de anticuerpo, y determinar la fijación del segundo fragmento de anticuerpo a dicho complejo, lo que indica la presencia del analito en la muestra, caracterizado por que dicho analito es el THC y dicho primer fragmento de anticuerpo que se fija de forma específica al THC comprende las secuencias aminoacídicas de SEQ ID n.º 1 y de SEQ ID n.º 2, y dicho segundo fragmento de anticuerpo comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una cadena ligera y una cadena pesada de anticuerpo, en donde dichas regiones de la cadena ligera tienen las secuencias aminoacídicas de los aminoácidos 23 a 35, 51 a 57 y 93 a 100 de la SEQ ID n.º 3, y dichas regiones de la cadena pesada tienen las secuencias aminoacídicas de los aminoácidos 29 a 35, 50 a 60 y 99 a 109 de la SEQ ID n.º 4.

10. El inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende la utilización de un inmunoensayo homogéneo acompetitivo, preferiblemente TR-FRET.

11. El inmunoensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en donde la muestra a analizar se selecciona del grupo que consiste en sangre, orina y líquido oral.

12. El inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el THC se determina en la saliva.

13. Un polinucleótido que codifica el fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

14. Una célula hospedadora que expresa el fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

Fab T3 anti-THC

Cadena ligera del Fab T3 contra el THC

DIVLTQSPTTMAASPGEKITITC**SASSSISSNYLH**WYQQKPG
FSPKLLIY***RTSNLAS***GVPARFSGSGSGTSYSLTIGT
MEAEDVATYYC**QQGSSIPLT**FGAGTKLELKRADAAPTVSI
FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN
GVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEAT
HKTSTSPIVKSFNRNEC

VH-CH1 del Fab T3 contra el THC

AEVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GFTFNNYVMV**
WLRQTPEKRLEWVA***SISRGGSTYYPDSVKG***RF
TISRDNARNILNLQMSSLRSEDTAMYYCVR**GTTIVAG**
DVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTN
SMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAV
LQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASS
TKVDKKIVPRDCG

CDR1
CDR2
CDR3

Fig. 1

ES 2 566 501 T3

Fab 104 contra el complejo inmunitario T3+THC

Cadena ligera del Fab 104:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISC**TGSSGSIASNY**
VQWYQQRPGSAPTTVIY***EDNQRPS***GVPDRFS
GSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQ**SYDSS**
NQVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL
QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA
GVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHK
SYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS

VH-CH1-6His-Tag del Fab 104

QVQLVQSGTEVKKPGATVKISCKFSGDN**FIDYYMH**WV
KQAQGKGLEWLG***LVDLGDGQTIY***AEKFHGRGTITADS
SRDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA**AKAYRQGVMDV**W
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCH
HHHHH

CDR1
CDR2
CDR3

Fig. 2

ES 2 566 501 T3

Reactividad cruzada de THC por TR-FRET

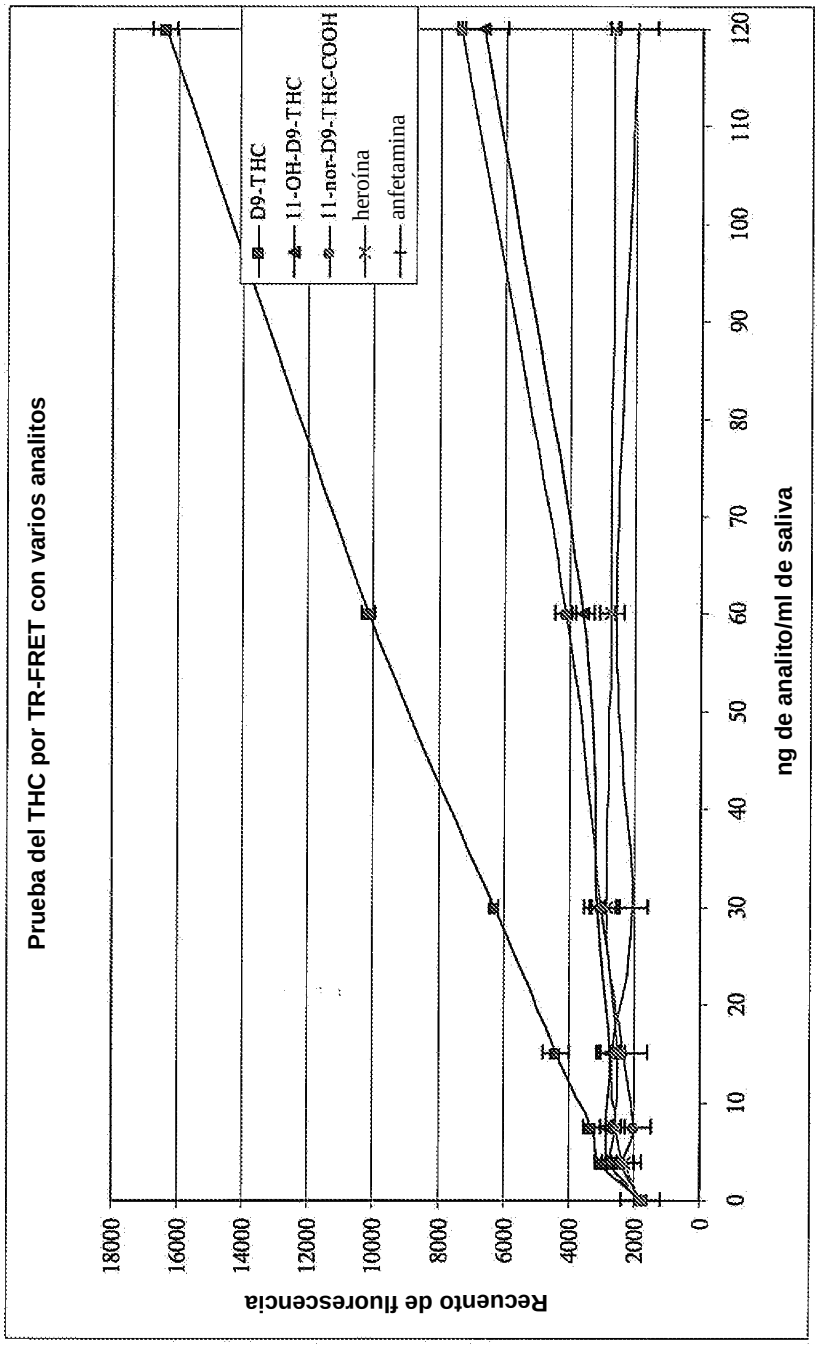

Fig. 3