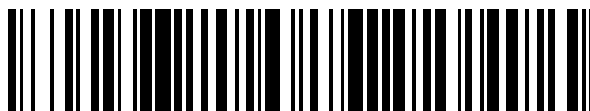


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 075**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

G01N 33/541 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2013** **E 13152851 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 2759550**

54 Título: **Procedimiento y kit para detectar 1,25-dihidroxitamina D y anticuerpos relacionados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.01.2019

73 Titular/es:

**DIASORIN S.P.A. (100.0%)
Via Crescentino snc
13040 Saluggia (Vercelli), IT**

72 Inventor/es:

**SOLDO, JOSHUA;
OLSON, GREGORY;
LUTTERMAN, MICHAEL;
WALL, JOHN;
NEW, MICHAEL;
DELUCA, HECTOR FLOYD y
BONELLI, FABRIZIO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 696 075 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 y kit para detectar 1,25-dihidroxitamina D y anticuerpos relacionados

5 La presente invención se refiere a un procedimiento y kit para detectar la 1,25-dihidroxitamina D total en una muestra de fluido biológico, tal como una muestra de sangre completa, plasma, suero u orina.

Más en particular, la presente invención se refiere a un procedimiento y kit de inmunoensayo, así como a los anticuerpos relacionados, adecuados para detectar la 1,25-dihidroxitamina D total en una muestra de fluido biológico que puede contener 1,25-dihidroxitamina D conjuntamente con otras formas no activas de vitamina D, tal como 25-hidroxitamina D.

15 La vitamina D es una hormona esteroidea que desempeña un papel fundamental en el metabolismo óseo y la homeostasis del calcio. En humanos y animales, las principales formas de vitamina D son la vitamina D₃ (colecalfiferol) y la vitamina D₂ (ergocalciferol). La vitamina D₃ se sintetiza principalmente en la piel a partir del 7-deshidrocolesterol en respuesta a la exposición a los rayos ultravioletas B (UVB) solares, pero el aporte de vitaminas también puede producirse a partir de fuentes dietéticas tales como el pescado graso, es decir, el salmón y la caballa. La vitamina D₂ se adquiere principalmente en la dieta a partir de fuentes fúngicas y vegetales, así como del aporte complementario (por ejemplo, Drisdol™ o Sterogyl 15 "A").

20 Independientemente de la fuente, la conversión de las vitaminas D₂ y D₃ en un compuesto bioactivo requiere dos etapas de hidroxilación separadas. En el hígado, la enzima 25-hidroxilasa convierte la vitamina D en 25-hidroxitamina D (a continuación en el presente documento denominada "25(OH)D"). Este metabolito intermediario es la principal forma circulante de la hormona y sirve como depósito para la hidroxilación posterior del metabolito biológicamente activo 1,25-dihidroxitamina D (a continuación en el presente documento denominado "1,25(OH)₂D").

30 La última etapa tiene lugar principalmente en las células tubulares renales y es catalizada por la enzima 1-alfa-hidroxilasa. Las concentraciones plasmáticas de 1,25(OH)₂D están altamente reguladas por una variedad de factores, que incluyen la hormona paratiroidea sérica (PTH), y normalmente son aproximadamente 1000 veces más bajas que el compuesto precursor 25(OH)D.

35 Debido a su naturaleza lipófila, la mayoría de la vitamina D y metabolitos de la misma circulan en la corriente sanguínea unidos a la proteína de unión a la vitamina D (DBP) (80-90 %), también conocida como globulina Gc, y albúmina (10-20 %). La DBP tiene una alta afinidad por los metabolitos de la vitamina D ($K_a = 5 \times 10^8 M^{-1}$ para 25(OH)D y $4 \times 10^7 M^{-1}$ para 1,25(OH)₂D y vitamina D), de modo que, en circunstancias normales, solo aproximadamente un 0,03 % de 25(OH)D y 24,25(OH)₂D y aproximadamente un 0,4 % de 1,25(OH)₂D se encuentran en forma libre.

40 Los efectos biológicos de 1,25(OH)₂D están mediados principalmente por la unión de esta hormona bioactiva a un receptor intracelular específico de vitamina D (VDR), que actúa principalmente regulando la expresión de genes cuyos promotores contienen secuencias de ADN específicas conocidas como elementos de respuesta de la vitamina D (VDRE).

45 El receptor de la vitamina D (VDR) es un regulador de la transcripción dependiente de ligandos que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (NR). Al igual que los otros miembros de esta familia de receptores, el VDR posee una estructura modular que comprende un dominio A/B aminoterminal, un dominio de unión a ADN (DBD) altamente conservado, una región conectora flexible y un dominio de unión a ligando (LBD) C-terminal que es más variable (Mangelsdorf DJ et al., 1995, Cell 83(6):835-9). El LBD C-terminal es un dominio globular multifuncional, responsable de la unión a hormonas, la dimerización con receptor X retinoide (RXR) y la interacción con correpresores y coactivadores, que todos juntos son esenciales para la regulación de las actividades transcripcionales (Haussler MR, et al. 1998, J Bone Miner Res. 13(3):325-49).

55 El dominio de unión a ligando (LBD) de VDR se ha cristalizado recientemente y su estructura se ha resuelto (Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Klaholz B, Moras D The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. Mol Cell 2000; 5:173-179).

60 La unión del ligando al VDR induce un cambio conformacional en el dominio de unión a ligando del receptor, que a su vez aumenta la heterodimerización del VDR con un cofactor, el receptor X retinoide (RXR), en un elemento sensible a la vitamina D (VDRE) en la región promotora de los genes diana. Esto, a su vez, da lugar a la apertura del promotor a la maquinaria transcripcional (Glenville J. et al., 1998 Physiology Reviews 78 (4): 1193-1231).

65 Los dominios de unión a ligando (LBD) de los receptores nucleares son conocidos por tener un alto contenido de hélice alfa, que puede sufrir un gran cambio conformacional en respuesta a la unión a ligandos, formando una bolsa hidrófoba. Recientemente, las diferencias en la conformación del dominio de unión a ligando de *Rattus norvegicus* (r-

VDR-LBD) cuando se une a diversos ligandos se resolvieron mediante espectroscopia de RMN (Kiran K. Singarapu et al. 2011 Biochemistry 50 (51): 11015-24).

La vitamina D está reconocida actualmente como una prohormona que tiene múltiples funciones en el mantenimiento de una salud óptima en los seres humanos. Desde hace mucho tiempo está confirmado que la una carencia marcada de vitamina D da como resultado enfermedades óseas histológicamente evidentes tales como la osteomalacia en adultos y el raquitismo en niños, mientras que la insuficiencia de vitamina D puede causar alteraciones en la concentración de hormona paratiroidea que, si persiste en el tiempo, puede contribuir a una disminución de la masa ósea y fracturas. Sin embargo, aunque inicialmente se identificó como un regulador clásico de la homeostasis del calcio, ahora se sabe que la vitamina D tiene un espectro más amplio de acciones, impulsada por la amplia expresión y distribución en los tejidos humanos del receptor de la vitamina D (VDR).

En las últimas décadas, los datos clínicos y epidemiológicos han proporcionado varias evidencias de que los niveles alterados de 25(OH)D se asocian con un riesgo creciente de diversas enfermedades crónicas que incluyen cardiovasculopatías, hipertensión, infarto de miocardio, diabetes, cáncer, reducción de la función neuromuscular, y enfermedades infecciosas y autoinmunitarias. Incluso complicaciones del embarazo tales como la preeclampsia, la diabetes gestacional, la cesárea y el parto prematuro podrían ser la secuela trágica de las carencias de vitamina D gestacional (Holick MF; 2007 N Engl J Med. 357(3):266-81, Holick MF y Chen TC. 2008 Am J Clin Nutr.; 87(4):1080S-6S).

Sin embargo, se han llevado a cabo muy pocos estudios para asociar los riesgos de enfermedad crónica con los niveles de 1,25(OH)₂D, debido tanto a la complejidad como a la falta de fiabilidad del procedimiento de medición disponible en la actualidad.

Por lo tanto, la determinación de la 1,25(OH)₂D circulante, que es la forma activa de la vitamina D, está adquiriendo una relevancia cada vez mayor en muchas aplicaciones clínicas diferentes, ya sea como un marcador de diagnóstico y/o como un indicador para la monitorización del tratamiento. Por ejemplo, la determinación de los niveles séricos de 1,25(OH)₂D y hormona paratiroidea (PTH) y una posible correlación de los mismos puede representar una medida importante para ayudar en el diagnóstico de enfermedades paratiroideas, así como para la detección de la aparición de hiperparatiroidismo secundario durante la evolución de la insuficiencia renal o el desarrollo de raquitismo resistente a la vitamina D (VDRR).

Actualmente, tanto en el uso clínico de rutina como en el de investigación, existe una amplia variedad de metodologías disponibles para medir los niveles circulantes de la 25(OH)D total (es decir, 25(OH)D₃ + 25(OH)D₂). Abbott Diagnostics (Abbott Park, IL, EE. UU., ensayo de vitamina 25-OH-D ARCHITECT), DiaSorin Inc. (Stillwater, MN, EE. UU., ensayo de vitamina 25 OH D total LIAISON®), Immunodiagnostic Systems (Boldon, Inglaterra, ensayo de 25-hidroxivitamina D (25OHD) IDS-iSYS), Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania, ensayo de vitamina D total Modular Analytics E170 Elecsys®) y Siemens Healthcare Diagnostics (Tarrytown, NY, EE. UU., ensayo de vitamina D total ADVIA Centaur®) suministran procedimientos de inmunoensayo basados en quimioluminiscencia, comerciales, rápidos y automatizados. Además de estas plataformas de ensayo, recientemente ha habido un aumento constante del uso de procedimientos físicos basados en la separación cromatográfica seguida de detección directa no inmunológica (cromatografía de líquidos semiautomatizada acoplada a espectrometría de masas en tándem, LC-MS/MS), que se han desarrollado principalmente en laboratorios especializados en los Estados Unidos (por ejemplo, Esoterix Inc. en Calabasas Hills, CA, Mayo Clinic en Rochester, MN, ARUP Laboratories en Salt Lake City, UT y Quest Diagnostics en Lyndhurst, NJ), Europa (por ejemplo, la Universidad de Gante en Gante, Bélgica, y CHU de Liège en Lieja, Bélgica) y Australia (por ejemplo, Pathology Queensland en Herston Queensland y Douglass Hanly Moir Pathology en Macquarie Park NSW).

A pesar de la amplia selección de plataformas de ensayo para medir la 25(OH)D, no existen procedimientos de ensayo automatizados disponibles actualmente para la determinación cuantitativa de la forma activa de vitamina D en muestras clínicas. Los niveles en la circulación sistémica de 1,25(OH)₂D son extremadamente bajos, en el intervalo de pg/ml, y, por lo tanto, representan un desafío bioanalítico significativo para la monitorización clínica. La cuantificación de 1,25(OH)₂D en plasma se ha realizado tradicionalmente por radioinmunoensayo (RIA). Para evitar problemas relacionados con la manipulación de la radiactividad y la vida útil limitada de los marcadores radiactivos, recientemente han surgido nuevos procedimientos para someter a prueba la vitamina D que se basan principalmente en el empleo de la metodología de LC-MS/MS. Sin embargo, los ensayos bioanalíticos de LC-MS/MS para 1,25(OH)₂D de los que se ha informado sufren los extensos procedimientos de preparación de muestras o los protocolos de derivatización que deben llevarse a cabo para lograr la sensibilidad y selectividad requeridas. En la actualidad, los principales procedimientos disponibles para la detección de 1,25(OH)₂D requieren realizar varios pretratamientos de las muestras o etapas preanalíticas que normalmente se llevan a cabo de forma manual y, por lo tanto, pueden requerir mucho tiempo y trabajo y ser caros.

El documento EP 0 583 945 A divulga un ensayo para 1,25(OH)₂D que consiste en extraer suero sanguíneo usando un disolvente orgánico tal como acetato de etilo, separar otros metabolitos de la vitamina D potencialmente interferentes usando una columna de sílice y, a continuación, añadir proteína receptora de cerdo, 1,25(OH)₂D

radiomarcada, anticuerpo biotinilado que se puede unir al receptor y una proteína facilitadora tal como BSA como parte de un ensayo de unión competitiva por inmunoprecipitación.

5 El documento WO/8901631 divulga un ensayo de unión competitiva para 1,25(OH)₂D (3) que implica añadir proteína receptora de cerdo, 1,25(OH)₂D radiomarcada y anticuerpo biotinilado que se puede unir al receptor para suero sanguíneo no tratado. El ensayo de unión competitiva requiere el uso de proteína transportadora de la vitamina D, que actúa como pantalla para minimizar la interferencia de los metabolitos relacionados.

10 SWAMI N ET AL. Bone, vol. 28, N.º 3, marzo de 2001, páginas 319-326 divulga anticuerpos monoclonales creados específicamente contra un fragmento sintético de VDR humano no unido, útil para determinar los niveles de VDR en muestras biológicas. La diana de estos anticuerpos es el VDR en su forma libre.

15 El documento WO 2012/104643 divulga un procedimiento y una molécula para medir la vitamina D en una muestra. La molécula se une a apo-DBP (es decir, la proteína de unión a la vitamina D no unida). Se usa una molécula de reconocimiento, que puede reconocer tanto holo como apo-DBP, para la unión preferentemente a holo-DBP sobre el complejo molécula-DBP.

20 El RIA DiaSorin (n.º cat. 65100E/100 Tubos; 1,25-dihidroxitamina D) implica el uso de disolventes orgánicos, instrumentos de extracción y columnas de C18-OH para separar metabolitos de la vitamina D potencialmente interferentes tales como 24,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D y 25(OH)D para aislar 1,25(OH)₂D de la muestra problema antes de la medición del metabolito.

25 Incluso el ensayo automatizado recientemente comercializado suministrado por Immunodiagnostics para la determinación de 1,25(OH)₂D (n.º cat. IS-2400; IDS-iSYS 1,25-Dihydroxyvitamin D) requiere una etapa de pretratamiento de las muestras que exige mucho tiempo y trabajo que hace uso de las inmunocápsulas patentadas de IDS.

30 Además, los procedimientos de la técnica anterior a menudo tienen limitaciones en lo que respecta a la especificidad de los ensayos, ya que los eventos de reactividad cruzada con otros metabolitos de la vitamina D no eliminados por completo de las muestras problema durante las etapas preanalíticas o de pretratamiento de las muestras pueden dar lugar a la medición de concentraciones erróneas más altas de 1,25(OH)₂D. Por ejemplo, la mayoría de los anticuerpos de inmunoensayos tienen reacciones cruzadas significativas con 25(OH)D, 24,25(OH)₂D y 25,26(OH)₂D que pueden estar presentes en la sangre a niveles 1000 veces mayores que la 1, 25(OH)₂D.

35 Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar un procedimiento de ensayo para detectar la 1,25(OH)₂D total (1,25(OH)₂D₂ + 1,25(OH)₂D₃) que no presente los inconvenientes. y limitaciones de la técnica anterior.

40 En particular, existe la necesidad de un procedimiento de ensayo que permita la detección precisa, sensible y exacta de la 1,25(OH)₂D total (1,25(OH)₂D₂ + 1,25(OH)₂D₃) sin requerir etapas de pretratamiento de las muestras que precisen mucho tiempo y trabajo, y que posiblemente se pueda proporcionar en un formato automatizado.

También existe la necesidad de un procedimiento de ensayo de la 1,25(OH)₂D que no presente una reactividad cruzada sustancial con otros metabolitos de la vitamina D que puedan estar presentes en la muestra problema.

45 Estas y otras necesidades se cubren con el procedimiento, y el kit y los anticuerpos relacionados, como se define en las reivindicaciones adjuntas, que forman parte integral de la descripción.

50 Como se ilustra además en los ejemplos a continuación, la presente invención se basa en el descubrimiento de que el pH del medio en el que se realiza el ensayo influye significativamente en la afinidad de unión de la proteína de unión a la vitamina D (DBP) y del dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD) por 1,25(OH)₂D.

55 Más específicamente, los resultados de los experimentos realizados por los autores de la presente invención mostraron claramente que un cambio en el valor del pH de la muestra problema por encima de 6, preferentemente por encima de 7, induce sorprendentemente un aumento de aproximadamente 200 veces de la afinidad del VDR-LBD por 1,25(OH)₂D con respecto a 25(OH)D, mientras que, al mismo valor de pH, la DBP presenta una afinidad aproximadamente 1000 veces mayor por 25(OH)D con respecto a 1,25(OH)₂D. La explotación de un efecto tan ventajoso del pH en el equilibrio entre 1,25(OH)₂D unida a la DBP y 1,25(OH)₂D unida al VDR-LBD representa, por lo tanto, una herramienta única en términos tanto de facilidad como de eficacia para capturar selectivamente la 1,25(OH)₂D circulante de la DBP natural en presencia de un exceso molar de VDR-LBD, dejando al mismo tiempo la mayoría de 25(OH)D en una forma secuestrada unida a la DBP. Dicho enfoque es particularmente ventajoso con respecto a los procedimientos de la técnica anterior, que requieren etapas de pretratamiento de las muestras que exigen mucho tiempo y trabajo para permitir la determinación de 1,25(OH)₂D en muestras clínicas.

65 Dado que se sabe que la unión de 1,25(OH)₂D al VDR-LBD induce un cambio conformacional en la molécula del VDR-LBD, los autores de la presente invención han llevado a cabo una extensa experimentación para desarrollar un

resto de captura, tal como un anticuerpo, que pueda reconocer específicamente y unirse al VDR-LBD unido a 1,25(OH)₂D, para discriminar selectivamente el complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D del VDR-LBD no unido en varias matrices biológicas. Dicho resto de captura específico para la conformación es particularmente útil, ya que representa una herramienta inestimable para la detección rápida y fiable de la forma activa circulante de la vitamina D.

Por tanto, un aspecto de la presente invención es un procedimiento para detectar 1,25(OH)₂D o un análogo de la misma en una muestra de fluido biológico, como se define en la reivindicación 9 adjunta.

También está dentro del alcance de la invención un kit para detectar 1,25(OH)₂D o un análogo de la misma en una muestra de fluido biológico, como se define en la reivindicación 18 adjunta.

El término "vitamina D" como se usa en la presente descripción se refiere tanto a la vitamina D₃ (colecalfiferol) como a la vitamina D₂ (ergocalciferol), y el término "1,25(OH)₂D" se refiere tanto a 1,25(OH)₂D₃ como a 1,25(OH)₂D₂. Los análogos de 1,25(OH)₂D incluyen versiones modificadas y análogos estructurales de la misma, tal como, por ejemplo, 19-nor-1 α -25-dihidroxitamina D₂ (por ejemplo, Zemplan o paricalcitol de Abbott), 1 α -hidroxivitamina D₂ o 1 α -hidroxiergocalciferol (por ejemplo, Hectorol o doxercalciferol de Genzyme), y 2-metilen-19-nor-(20S)-1 α ,25-(OH)₂D₃ (por ejemplo, 2MD de Deltanoid Pharmaceuticals).

Como se menciona anteriormente, un rasgo característico distintivo del procedimiento de detección de la presente invención es que el pH de la muestra de fluido biológico en examen se ajusta a un valor superior a 6, es decir, comprendido entre 6 y 9. Los valores de pH preferentes están comprendidos entre 7 y 8,6, tal como 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5 u 8,6. Los agentes tamponadores y las soluciones tampón adecuadas para ajustar el pH de una muestra de fluido biológico a los valores mencionados anteriormente son bien conocido por los expertos en la técnica.

En el contexto de la presente invención, la muestra de fluido biológico se selecciona preferentemente del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma y orina. La muestra de fluido biológico puede incluir opcionalmente componentes adicionales, tales como, por ejemplo: diluyentes, conservantes, agentes estabilizantes y/o tampones. Si es necesario, las diluciones de la muestra de fluido biológico se preparan usando cualquier tampón diluyente adecuado conocido en la técnica.

El procedimiento de detección de la presente invención se caracteriza además por que se emplea una proteína receptora que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD) para unirse a 1,25(OH)₂D o un análogo de la misma.

El término "proteína receptora que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD)", como se usa en la presente descripción, engloba tanto la proteína receptora de la vitamina D (VDR) completa, que incluye el dominio de unión a ligando C-terminal y el dominio de unión a ligando (LBD) del receptor de la vitamina D en una forma aislada o genomaniplada.

Por ejemplo, toda la proteína receptora de la vitamina D o el dominio de unión a ligando de la misma es una proteína recombinante generada por tecnologías de ADN. Las secuencias de nucleótidos que codifican el receptor de la vitamina D de varias especies animales están disponibles y caracterizadas. Por tanto, la proteína receptora de la vitamina D completa o el dominio de unión a ligando de la misma usado en la presente invención como proteína receptora es, por ejemplo, pero sin limitación, de origen mamífero (por ejemplo, una proteína humana, de ratón o rata) o de origen aviar o de origen anfibio; de forma alternativa, es una variante mutada de cualquiera de dichas proteínas.

Opcionalmente, la proteína receptora de la vitamina D completa o el dominio de unión a ligando de la misma usado como proteína receptora en la presente invención comprende además o está acoplada a una etiqueta de afinidad para mejorar sustancialmente los procedimientos de purificación y/o detección. Entre las etiquetas de afinidad más comunes, las etiquetas de polihistidina ("His-tag") unidas al extremo C-terminal o N-terminal de la proteína de interés se emplean de manera rutinaria en las ciencias de las proteínas y su uso dentro del contexto de la presente invención está, por lo tanto, dentro del conocimiento del experto en la materia. Las proteínas etiquetadas con His expresadas se purifican fácilmente, por ejemplo, en matrices que contienen iones metálicos de transición, y el uso de anticuerpos anti-His-tag representa una herramienta útil y conocida en estudios de localización e inmunoprecipitación.

Por lo tanto, en un modo de realización preferente de la presente invención, la proteína del receptor de vitamina D completa o el dominio de unión a ligando de la misma usados como proteína receptora es una proteína de fusión recombinante etiquetada con His. Sin embargo, se pueden emplear otras etiquetas de afinidad tales como, por ejemplo, Arg5, Strep-tag II, FLAG, fluoresceína (FITC), Poly(A), Poly(dT) y biotina. Las técnicas para la producción de proteínas recombinantes etiquetadas con epítopos son, en general, conocidas en la técnica. En otro modo de realización preferente, la proteína receptora de vitamina D completa o el dominio de unión a ligando de la misma usado como proteína receptora se acopla a una proteína chaperona o, en general, a cualquier otra proteína que

tenga una función similar a la chaperona, para ayudar al plegamiento de la proteína y/o mejorar la estabilidad. Dentro del contexto de la invención también se puede emplear una proteína receptora (es decir, la proteína receptora de la vitamina D completa o el dominio de unión a ligando de la misma, posiblemente acoplado a una etiqueta de afinidad o una proteína chaperona o similar a la chaperona) que lleva una mutación en la secuencia de aminoácidos destinada a mejorar la estabilidad.

Como se menciona anteriormente, el procedimiento de detección de la presente invención implica el uso de un resto de captura que se puede unir al complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D reconociendo específicamente el VDR-LBD modificado conformacionalmente unido a 1,25(OH)₂D o un análogo de la misma.

En un modo de realización preferente, el resto de captura es un anticuerpo como se define en la reivindicación 1 adjunta.

Dado que los autores de la presente invención han puesto a disposición por primera vez un anticuerpo que tiene la especificidad de unión definida en la reivindicación 1 adjunta, el anticuerpo *per se* también cae dentro del alcance de la presente invención.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención es un anticuerpo que se une específicamente el dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD), caracterizado por que discrimina selectivamente entre un complejo formado entre VDR-LBD y 1,25(OH)₂D o un análogo de la misma y VDR-LBD sin complejar.

Preferentemente, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal. Como se describe en los ejemplos, los autores de la presente invención produjeron varios clones de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales que pueden reconocer y unirse específicamente al VDR-LBD modificado conformacionalmente unido a 1,25(OH)₂D sin reactividad cruzada sustancial con el VDR-LBD sin complejar. Uno de dichos clones de hibridoma, designado como 11B4H11H10, produce un anticuerpo monoclonal que se caracterizó completamente por secuenciación, para identificar las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de sus dominios variables de cadena pesada y ligera. También se identificaron las CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de los dominios variables de cadena tanto pesada como ligera.

Dichas secuencias de aminoácidos y ácido nucleicos se ilustran en el listado de secuencias, que forma parte integrante de la descripción; en el listado de secuencias, las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos del dominio variable de cadena pesada de 11B4H11H10 se designan como SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente; las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos del dominio variable de cadena ligera de 11B4H11H10 se designan como SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, respectivamente; las CDR del dominio variable de cadena pesada de 11B4H11H10 se designan como SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y las CDR del dominio variable de cadena ligera de 11B4H11H10 se designan como SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

Por lo tanto, de acuerdo con un modo de realización preferente, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y/o el dominio variable de cadena ligera comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, 5 y 6. En un modo de realización más preferente, el dominio variable de cadena pesada comprende las CDR SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y/o el dominio variable de cadena ligera comprende las CDR SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

En un modo de realización particular, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 o está codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia SEQ ID NO: 8 y/o el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 o está codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia SEQ ID NO: 10.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente descripción engloba una molécula de anticuerpo completa (incluyendo versiones policlonales, monoclonales, quiméricas, humanizadas o humanas que tienen cadenas pesadas y ligeras de longitud completa), así como un fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno. Un "fragmento de anticuerpo" incluye cualquier fragmento de inmunoglobulina que tenga la misma especificidad de unión que el anticuerpo completo correspondiente. Dichos fragmentos se producen de acuerdo con procedimientos estándar; consúltese, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, EE. UU., 1988. Los ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos incluyen F(ab), Fab', F(ab')₂, F(v), anticuerpos monocatenarios (scFv), F(c), F(d).

El anticuerpo de la presente invención se produce preferentemente por inmunización animal. Brevemente, los anticuerpos monoclonales se generan inyectando a animales, por ejemplo, ratas, hámsteres, conejos o ratones, un inmunógeno que comprende el VDR-LBD modificado conformacionalmente unido a la vitamina 1,25-(OH)₂D o un análogo de la misma, de acuerdo con procedimientos conocidos *per se* (Costagliola et al., J Immunol 1998; 160:1458-65). La presencia de producción específica de anticuerpos se monitoriza después de la inyección inicial y/o después de una inyección de refuerzo realizando un ensayo de inmunodetección en una muestra de suero

obtenida de los animales inyectados. De los animales que resulte que producen el(los) anticuerpo(s) específico(s) de interés, se extraen células del bazo y posteriormente se fusionan con una pareja de fusión de células de mieloma para generar líneas celulares de hibridoma que, a continuación, se analizan para determinar su capacidad para secretar el(los) anticuerpo(s) de interés, es decir, anticuerpos que se unan específicamente al VDR-LBD del complejo formado entre VDR-LBD y 1,25(OH)₂D o un análogo de la misma.

En el procedimiento de detección de la presente invención, la detección del complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D capturado se puede lograr a través de una amplia variedad de técnicas. Por ejemplo, se puede generar una señal detectable directamente empleando una proteína receptora marcada o indirectamente por medio de una molécula detectora marcada que se puede unir al complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D capturado por el resto de captura. Típicamente, la molécula detectora es otro anticuerpo dirigido a un epítipo en el complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D que es diferente del epítipo reconocido por el resto de captura de la invención (es decir, un anticuerpo detector anti-VDR-LBD).

El marcador detectable puede ser cualquier sustancia capaz de producir una señal que sea detectable por medios visuales o instrumentales. Los marcadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, compuestos radiactivos, enzimas y sustratos enzimáticos, moléculas adecuadas para detección colorimétrica, proteínas de unión, epítipos, enzimas o sustratos. En la práctica, cualquier molécula de señal o marcador conocida en la técnica se puede incorporar en modos de realización del procedimiento y kit de la presente invención.

Cualquier formato de ensayo que permita el contacto entre la muestra de fluido biológico y la proteína receptora que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD) es adecuado para llevar a cabo el procedimiento de detección de la invención.

De acuerdo con un modo de realización preferente, el procedimiento de detección de la invención es un inmunoensayo *in vitro* realizado en una muestra de fluido biológico de un sujeto o paciente. Los inmunoensayos incluyen ensayos tanto homogéneos como heterogéneos, así como ensayos de tipo sándwich competitivos y no competitivos.

Las figuras 1 y 2 ilustran, a modo de ejemplo, inmunoensayos no competitivos en un único sitio de acuerdo con la invención, en los que el complejo formado por medio de la unión de 1,25(OH)₂D a la proteína receptora marcada que comprende el dominio unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD) es capturado por el anticuerpo de captura específico para la conformación de la invención (que en las figuras 1 y 2 se designa como "anticuerpo monoclonal anti-LBD unido") inmovilizado sobre un soporte sólido. En los ejemplos de las figuras 1 y 2, el soporte sólido es una partícula paramagnética (PMP) y el marcador es aminobutiletileisoluminol (ABEI).

En el modo de realización específico de la figura 1, la etapa de ajustar el pH de la muestra de fluido biológico con el tampón de ensayo y la etapa de añadir la proteína receptora que comprende el VDR-LBD a la muestra se realizan simultáneamente. En el modo de realización específico de la figura 2, dichas etapas se llevan a cabo secuencialmente.

La figura 3 ilustra, a modo de ejemplo, un inmunoensayo de tipo sándwich. Las características y procedimientos generales de los inmunoensayos de tipo sándwich están bien establecidos y son conocidos por los expertos en la técnica. Un inmunoensayo de tipo sándwich es un modo de realización particularmente preferente del procedimiento de la presente invención.

El inmunoensayo de tipo sándwich de la figura 3 implica la unión del complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D al anticuerpo de captura específico para la conformación (designado como "anticuerpo monoclonal anti-LBD unido") inmovilizado sobre un soporte sólido (por ejemplo, una partícula paramagnética, PMP) y el uso de un anticuerpo detector marcado como la segunda parte del sándwich. El anticuerpo detector está directamente marcado o es reconocido por un conjugado que consiste en un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado (en el ejemplo específico de la figura 3, el anticuerpo detector está marcado directamente con ABEI). La cantidad de anticuerpo marcado unido directa o indirectamente al complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D se mide a continuación por medios adecuados.

El inmunoensayo de tipo sándwich puede implicar el uso de una proteína receptora etiquetada que comprende VDR-LBD en combinación con un anticuerpo detector antietiqueta. En este modo de realización, la detección del complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D capturado por el anticuerpo de captura específico para la conformación se logra mediante la unión específica del anticuerpo detector a la etiqueta presente en el complejo. Preferentemente, la etiqueta es una etiqueta de polihistidina. En un modo de realización más específico, la etiqueta es una proteína chaperona.

Los inmunoensayos que se encuentran dentro del alcance de la invención pueden estar en cualquier formato adecuado, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos por quimioluminiscencia o fluorescencia, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), micromatrices de microesferas basadas en Luminex, ensayos de micromatrices de proteínas, o formatos de prueba rápida tal como, por ejemplo, pruebas de tira inmunocromatográfica.

Dependiendo del formato del inmunoensayo, el anticuerpo de captura y/o el anticuerpo detector se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido. Ejemplos no limitativos de soportes sólidos adecuados son los pocillos de una placa de microtitulación, la superficie de una micropartícula tal como látex, poliestireno, sílice, sefrosa quelante o microesferas magnéticas, membranas, tiras o matrices.

Como se menciona anteriormente, otro aspecto de la presente invención es un kit para detectar $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ o un análogo de la misma en una muestra de fluido biológico, comprendiendo el kit la proteína receptora y el resto de captura como se define anteriormente en relación con el procedimiento, así como un tampón de unión que tiene un pH comprendido entre 6 y 9. Los valores de pH preferentes están comprendidos entre 7 y 8,6, tal como 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5 u 8,6. Los ejemplos preferentes, pero no limitativos, del tampón de unión para ajustar el pH de la muestra problema incluyen tampón Tris 50 mM (pH 7,4), Hepes (6,5-7,5), PBS.

El kit de la invención puede comprender además un soporte sólido tal como, sin limitación, perlas, micropartículas, nanopartículas, partículas superparamagnéticas, una placa de microtitulación, una cubeta, un dispositivo de flujo lateral, una cubeta de lectura o cualquier superficie a la que una proteína o el péptido se puede unir de forma pasiva o covalente. La proteína receptora o el resto de captura del kit de la invención se pueden inmovilizar sobre el soporte sólido.

Además, el kit de la invención puede contener medios de detección como se describe anteriormente en relación con el procedimiento de detección.

La siguiente sección experimental se proporciona únicamente a modo de ilustración y no pretende limitar el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Expresión y purificación de la proteína VDR-LBD de rata

Para producir proteínas VDR-LBD recombinantes que se usen como reactivos adecuados para los procedimientos y kits de la invención, se construyó un vector de expresión basado en plásmidos. Brevemente, el ADN que codifica el dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D de los restos 116-423 de *Rattus norvegicus* con delección de un bucle interno de 47 aminoácidos (165-211) (rVDR-LBD) se clonó en el plásmido pET-29b (Novagen) usando la combinación de sitios de restricción N de I/Bgl II. Para facilitar la detección y purificación de la proteína VDR-LBD recombinante, se puede añadir una etiqueta de polihistidina en el extremo C de la proteína de interés mediante la clonación de una secuencia codificante de la etiqueta His corriente abajo de la secuencia codificante VDR-LBD, seguida de un codón de terminación.

Los plásmidos que codifican la proteína VDR-LBD se expresaron como cuerpos de inclusión en células BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (Stratagene) cultivadas en LB complementado con kanamicina (40 $\mu\text{g/l}$) y cloranfenicol (40 $\mu\text{g/l}$). Se inoculó un cultivo iniciador (5 ml) con una única colonia bacteriana y creció en un tubo de 14 ml a 37 °C (250 rpm) durante 6 horas para alcanzar una densidad óptica (OD600) de ~1. El cultivo iniciador se diluyó en un cultivo durante la noche (35 ml) en 2500 veces y creció en un matraz de 125 ml a 30 °C (250 rpm) durante 15 h (OD600 típica ~3,7). El cultivo durante la noche se diluyó en 0,5 l de los medios de expresión en un matraz de 2 l con una OD600 de ~0,09. El cultivo creció durante ~2,5 h (250 rpm) a una OD600 de 0,6-0,8 y la expresión de VDR-LBD se indujo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,35 mM. El cultivo continuó creciendo a 37 °C durante 6 h antes de recolectar las células mediante centrifugación a 5000 rpm (rotor GS3) a 4 °C durante 15 min. El sedimento celular recién recogido (típicamente 5,5 g/l de cultivo) se almacenó a -80 °C para purificación adicional de la proteína.

El sedimento celular (5,5 g) se resuspendió en 135 ml de tampón de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, DTT 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,3 mM y lisozima 0,5 mg/ml, y se sometió a sonicación con un desmembrador sónico (Fisher). El sedimento, que incluía residuos celulares y cuerpos de inclusión, se obtuvo por centrifugación a 11 000 rpm (rotor SS34) a 4 °C durante 15 min, y se lavó con 200 ml del tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) seguido de 200 ml del mismo tampón de lavado con Triton X-100 al 0,5 % (v/v). Después de cada adición, la suspensión se agitó suavemente durante 5 min y, a continuación, se centrifugó a 12 000 rpm a 4 °C durante 20 min. El sedimento final se suspendió muy suavemente en 200 ml de tampón desnaturizante que contenía ácido Tris-acético 40 mM (pH 7,6), EDTA 2 mM, guanidina-HCl 6 M y DTT 100 mM, y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se obtuvo una solución transparente mediante centrifugación a 12 000 rpm a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante se dializó frente a 20 l de tampón de diálisis que contenía $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 25 mM (pH 7,4), KCl 50 mM y DTT 2 mM a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, se extrajo un precipitado blanco mediante centrifugación y se recuperó el sobrenadante y se continuó la diálisis durante otras 24 h con dos cambios del tampón que contenía HEPES 16 mM (pH 7,4), NaCl 25 mM, KCl 15 mM y DTT 2 mM. La solución de proteína se concentró en un filtro centrífugo Amicon (10K MWCO) y se intercambió en el tampón final que contenía HEPES 16 mM (pH 7,4), NaCl 25 mM, KCl 15 mM y TCEP 10 mM. El intercambio de tampón se realizó mediante dilución y concentración repetidas para extraer el DTT que es incompatible con las

microesferas de His-tag. La pureza de la proteína se analizó mediante SDS-PAGE al 12 %. La concentración de proteína se determinó mediante el procedimiento de Bradford utilizando BSA como estándar (coeficiente de $0,055 \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$). El rendimiento típico de VDR-LBD es de 25-30 mg/l de cultivo y es altamente dependiente del nivel de expresión, que está determinado por la salubridad del cultivo y el procedimiento de diálisis.

EJEMPLO 2: Generación de anticuerpos monoclonales específicos para la conformación capaces de reconocer el complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D

La estrategia seguida por los autores de la presente invención para la generación de anticuerpos específicos para la conformación se basó en la explotación del complejo que consiste en el dominio de unión del receptor de la vitamina D (VDR-LBD) unido a 1,25(OH)₂D como inmunógeno. Se inyectaron alícuotas de uso individual del inmunógeno formulado con el adyuvante apropiado en ratones BALB/c. Después de 4, 6 y 8 semanas, los linfocitos de los bazo de los ratones se fusionaron con células de mieloma de ratón SP2/0 usando polietilenglicol (PEG) como agente de fusión. Las células híbridas se colocaron en placas en 384 pocillos en un formato de placa de cultivo de 96 pocillos de alto rendimiento.

La actividad inmunitaria específica del antígeno se determinó mediante ELISA directamente en las placas de fusión maestras, usando el inmunógeno de interés, es decir, el complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D, y el dominio de unión a ligando de la vitamina D no unido solo como control negativo. Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con 100 μl de 0,56 $\mu\text{g/ml}$ de proteína VDR-LBD recombinante etiquetada con His en la forma no unida o previamente unida con 1,25(OH)₂D, respectivamente. La reacción previa a la unión se llevó a cabo incubando la proteína VDR-LBD durante la noche en presencia de un exceso molar de tres de 1,25(OH)₂D (1 mg/ml). La adsorción de la proteína en las placas de microtitulación se logró por medio de interacciones específicas entre la etiqueta de polihistidina y un recubrimiento de iones de níquel presentes en la superficie de los pocillos. Después de la adsorción de la proteína, las placas se lavaron con PBS-T (Tween 20 al 0,1 % en PBS) y se incubaron con 100 μl de los anticuerpos monoclonales en examen diluidos 1:16 000, durante 1 hora a temperatura ambiente, con mezcla suave. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se incubaron con 100 μl de anticuerpo caprino contra IgG de ratón conjugado con HRP (1 mg/ml) diluido 1:30000 en PBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas lavadas se incubaron a continuación con 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de sustrato TMB a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 150 $\mu\text{l/pocillo}$ de solución de HCl al 1 %. La absorbancia a 450 nm se midió usando un lector de microplacas.

Dicha estrategia de cribado permitió la detección y selección de clones que secretan anticuerpos que muestran especificidad hacia el complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D solamente y no para el dominio de unión a ligando no unido (tabla 1). A continuación, los hibridomas seleccionados se clonaron mediante el procedimiento de dilución limitante y se volvieron a someter a cribado de acuerdo con el procedimiento ELISA descrito anteriormente. Se subclonaron clones con el título y la especificidad deseados para estabilizar la expresión del anticuerpo.

Cada uno de los clones seleccionados se sometió a prueba inicialmente para determinar el isotipo de la inmunoglobulina de ratón y posteriormente se expandió a la escala de producción. Después de la expansión del clon, se aislaron las IgG de ratón mediante purificación por afinidad con proteína A usando AKTAprime plus y se sometieron a un intercambio de tampón usando una columna de desalado Hitrap a tampón DPBS IX. La muestra de anticuerpo obtenida de este modo se esterilizó usando un filtro de 0,2 μm , se estimó la concentración de la muestra y el producto se envasó estéril en un tubo de polipropileno y se almacenó a 4 °C.

Como resultado de los estudios descritos anteriormente, el clon de hibridoma denominado 11B4H11H10 se seleccionó para análisis adicional.

Tabla 1

(Datos de cribado mediante ELISA obtenidos con 4 anticuerpos que se unen al complejo anti-VDR-LBD/1,25(OH) ₂ D)			
ID de clon de anticuerpo	Absorbancia en ELISA a 450 nm		Proporción
	Complejo VDR-LBD/1,25(OH) ₂ D	VDR-LBD no unido	
10A3	3,659	0,103	35,5
11B4	3,028	0,121	25,0
12C11	0,569	0,090	6,32
8E2	0,480	0,382	1,26

El procedimiento de selección ilustrado anteriormente también se puede usar para identificar otros clones de hibridoma que secretan anticuerpos de acuerdo con la presente invención, es decir, mAb o fragmentos funcionales

de los mismos que se pueden unir específicamente al dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D unido a 1,25-dihidroxivitamina D o el análogo de la misma.

EJEMPLO 3: Identificación de la secuencia consenso de ADN del gen VH y VL de inmunoglobulina G, expresado por el clon de hibridoma 11B4H11H10

Se descongeló un frasco de inóculo madre primario de 11B4H11H10 y se expandió para generar un número representativo de células para construcciones de la colección de ADNc. Brevemente, se aislaron 1×10^7 células de hibridoma de un cultivo con crecimiento logarítmico activo de células en un matraz de 75 cm² y se centrifugaron a 500 x g durante 4 minutos en un tubo de centrifuga estéril de polipropileno de 50 cm². El ARN total se aisló usando TRIzol® Reagent, Invitrogen, y se cuantificó en un Nanodrop™. Se retrotranscribió el ARN total del hibridoma (500 ng) usando el procedimiento del cebador oligo dT. Se amplificaron cadenas pesada variable (Vh) y ligera variable (VI) de las inmunoglobulinas de ratón a partir de la colección de ADNc (RT-PCR) usando cebadores específicos. Esas cadenas amplificadas se insertaron independientemente, en una orientación aleatoria, en un vector TOPO (Invitrogen) mediante clonación TA. El producto de ligado se transformó por electroporación en una cepa de mantenimiento electrocompetente de *E. coli*.

Se seleccionaron veinte colonias bacterianas independientes de cada placa de transformación y se expandieron por inoculación en 10 ml de caldo LBA (100 µg/ml de ampicilina) en un tubo con tapa de cierre de polipropileno de 15 ml y crecimiento a 37 °C durante la noche con agitación orbital a 250 rpm. Por tanto, se generó ADN de 20 plásmidos purificados tanto para Vh como para VI.

Cada uno de los veinte plásmidos TOPO Vh y VI iniciales se cribó mediante secuenciación automatizada de ADN (Functional Biosciences, Madison, Wisconsin) con reacción directa (5'-3') de un único duplicado usando un cebador de secuenciación T7 para determinar si estaba presente un inserto de Vh o VI de longitud completa. Tras la alineación de la secuencia, surgió una única Vh y VI representativa, lo que indica que la población de hibridomas en el momento del aislamiento del ARN era monoclonal.

Se seleccionaron hasta diez plásmidos representativos tanto para Vh como para VI, que contienen el inserto de longitud completa correspondiente, para obtener duplicados adicionales de la secuenciación de ADN. Más específicamente, se sometió cada plásmido a dos reacciones directas T7 e inversas BGH adicionales para construir la secuencia consenso.

Se realizaron alineaciones de ADN usando CLC Workbench para generar la novedosa secuencia consenso variable pesada y variable ligera de inmunoglobulina de ratón. Tras la traducción de las secuencias consenso de ADN identificadas en extensiones de aminoácidos, se empleó NCBI BLAST para el análisis de dominios de proteína Vh y VI para confirmar que las secuencias son genes de inmunoglobulina de ratón y para cartografiar dominios estructurales importantes, incluidas las regiones determinantes de complementariedad (CDR).

Las secuencias consenso de ADN del anticuerpo monoclonal designado como 11B4H11H10, así como las CDR del mismo, se ilustran en el listado de secuencias.

Ejemplo 4: Ensayo de 1,25(OH)₂D

Uno de los modos de realización preferentes del ensayo de la invención se desarrolló como sigue.

Se recubrieron micropartículas paramagnéticas (PMP) (DynaL, Noruega) con el anticuerpo monoclonal 11B4 siguiendo las instrucciones del proveedor. El VDR-LBD recombinante que se usó en el ensayo se preparó como se describe en el Ejemplo 1, y se acopló a una etiqueta de afinidad (designada a continuación como "TAG"). El anticuerpo monoclonal 11B4H11H10 que se usó en el ensayo se preparó como se describe en el Ejemplo 2. Se conjugó un anticuerpo monoclonal de ratón anti TAG con aminobutiletisoluminol cíclico (cABEL) en tampón PBS a pH 7,4. La incorporación de cABEL calculada fue de 2-3 moléculas por molécula de anticuerpo. Se prepararon calibradores añadiendo diferentes concentraciones de una solución etanólica de 1,25(OH)₂D en un suero humano sin esteroides y sin carbón vegetal. La formulación del tampón de ensayo consistió en TRIS 50 mM pH 7,4, CHAPS al 0,02 %, EDTA 1 mM, heparina a 8 mg/ml y 1 % de suero de ratón para mitigar las interferencias heterófilas de anticuerpos humanos antimurinos (HAMA).

Un desafío importante de un ensayo automatizado que no utiliza etapas preanalíticas/de pretratamiento de la muestra sin conexión es la capacidad del ensayo para capturar y detectar específicamente la cantidad total de 1,25(OH)₂D, o análogos de forma activa de la vitamina D, en una matriz biológica (por ejemplo, suero o plasma) sin interferencia de otros metabolitos de la vitamina D, tal como 25(OH)D, 24,25(OH)₂D y 25,26(OH)₂D que pueden estar presente en niveles 1000 veces más altos que 1,25(OH)₂D. Este desafío se complica además por la presencia de la proteína de unión a la vitamina D (DBP) y la albúmina, que son abundantes en la circulación y actúan como las principales proteínas de unión para 25(OH)D, 1,25(OH)₂D y otros metabolitos de la vitamina D, de forma que de un 85 % a un 90 % se una a la DBP y de un 10 a un 15 % se una a la albúmina. Además, los niveles de DBP aumentan hasta de 2 a 5 veces en estados con alto nivel de estrógenos, tal como el embarazo.

5 Por lo tanto, para verificar la capacidad del ensayo de la invención para capturar y detectar específicamente la cantidad total de 1,25(OH)₂D circulante de forma independiente de VDBP, los autores de la presente invención prepararon un panel de muestras de suero humano (N = 17; 8 sujetos aparentemente sanos y 9 mujeres embarazadas) que abarcan el intervalo de medición del ensayo. Los valores previstos de 1,25(OH)₂D (pg/ml) en estas 17 muestras se determinaron usando un radioinmunoensayo de 1,25(OH)₂D aprobado por la FDA de DiaSorin Inc. en Stillwater, MN, EE. UU. (n.º cat. 65100E/100 tubos; 1,25-dihidroxivitamina D), que a continuación se usó como procedimiento de referencia.

10 El ensayo ilustrado esquemáticamente en la figura 3 se llevó a cabo en el analizador DiaSorin LIAISON® (Saluggia, Italia). En primer lugar, se incubaron 50 µl de muestra de suero humano con 100 µl de tampón de ensayo y 50 µl de VDR-LBD-TAG durante 30 minutos. A continuación, se le añadió 20 µl de PMP recubiertas con anticuerpo monoclonal 11B4H11H10 y la mezcla de reacción se incubó durante otros 30 minutos. Después de lavar la mezcla de reacción, se le añadió 40 µl de anticuerpo monoclonal anti TAG conjugado con cABEL y la mezcla de reacción se incubó durante otros 30 minutos. Después de un segundo lavado, se le añadió soluciones de activación y la mezcla de reacción se leyó como unidades de luz relativa (RLU) en la cámara de lectura del analizador.

20 Para comparar el ensayo de 1,25(OH)₂D de la invención con el RIA de DiaSorin como procedimiento de referencia, las RLU obtenidas con cada muestra se transformaron en pg/ml en base a las RLU frente a la dosis (pg/ml) obtenida con la curva estándar ilustrada en la figura 4. La curva estándar de la figura 4 se obtuvo de la siguiente manera. Se prepararon calibradores de la curva estándar añadiendo diferentes concentraciones de una solución etanólica de 1,25(OH)₂D en un suero humano sin esteroides y sin carbón vegetal. Se representó gráficamente la respuesta del calibrador (RLU) con respecto a la dosis (pg/ml) utilizando una curva de dispersión con un ajuste polinomial de tercer orden. A continuación, las muestras de RLU se transformaron en pg/ml (tabla 2) y se llevó a cabo la correlación entre el ensayo y el procedimiento de referencia usando análisis mediante ajuste de Passing y Bablok, regresión lineal y curva del % de diferencia de Bland Altman. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 5A, 5B y 5C, respectivamente. Los análisis demuestran que las dosis determinadas con el ensayo de la invención y el ensayo de referencia de RIA de DiaSorin son sustancialmente equivalentes (pendiente de 0,89, intersección de 6,6 pg/ml, R² de 0,96 y diferencia media en % de -2,8 %), lo que indica que el ensayo de la invención puede capturar y detectar con exactitud la cantidad total de 1,25(OH)₂D circulante en suero humano independientemente de las concentraciones séricas de DBP.

35 Finalmente, para demostrar la recuperación específica de 1,25(OH)₂D en suero humano, se determinó la concentración (ng/ml) del total de 25(OH)D en cada muestra del panel (N = 17) usando el ensayo LIAISON® 25 OH Vitamin D con aprobación 510(k) de la FDA (n.º cat. 310600, DiaSorin Inc., Stillwater, MN, EE. UU.). Dado que no hubo correlación entre las dosis de 1,25(OH)₂D del RIA de DiaSorin con aprobación 510(k) y las dosis de 25(OH)D del ensayo LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL con autorización 510(k) (figura 6), se llegó a la conclusión de que el ensayo de 1,25(OH)₂D de la invención recupera específica y cuantitativamente la cantidad total de 1,25(OH)₂D en suero humano independientemente de las concentraciones séricas totales de 25(OH)D. Estos resultados se ilustran en la figura 6, que muestra que no existía una correlación significativa (p = 0,4546) entre las dosis de 1,25(OH)₂D y 25(OH)D.

Tabla 2

(Las RLU obtenidas con cada muestra se transformaron en dosis (pg/ml) en base a las RLU frente a la dosis obtenida con la curva estándar de LIAISON en la figura 4. Las dosis abarcaron el intervalo de medición del ensayo de 23,8 pg/ml (mínimo) a 164,0 pg/ml (máximo), con una media de 83,54 pg/ml e IC del 95 % 65,04 a 102,03 pg/ml)

N.º	ID de muestra	Sexo	Tipo	LIAISON 1,25(OH) ₂ D	
				RLU	Dosis (pg/ml)
1	M10284	Varón	Aparentemente saludable	246 408	81,9
2	M10279	Varón	Aparentemente saludable	231 717	73,7
3	M10302	Varón	Aparentemente saludable	183 344	48,1
4	F20378	Mujer	Aparentemente saludable	182 691	47,8
5	F20436	Mujer	Aparentemente saludable	260 932	89,8
6	F20198	Mujer	Aparentemente saludable	208 126	60,7
7	F20151	Mujer	Aparentemente saludable	221 471	68,0
8	F20416	Mujer	Aparentemente	137 640	23,8

9	8316745	Mujer	saludable	245 686	81,5
10	8316205	Mujer	Embarazada	419 906	164,0
11	8315465	Mujer	Embarazada	276 473	97,5
12	8315505	Mujer	Embarazada	201 329	57,1
13	8316605	Mujer	Embarazada	208 752	61,1
14	8316585	Mujer	Embarazada	373 007	142,0
15	8316765	Mujer	Embarazada	298 588	107,0
16	8316815	Mujer	Embarazada	261 589	90,1
17	8315375	Mujer	Embarazada	338.801	126,0

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> DiaSorin SpA	
	<120> Procedimiento y kit para la detección de 1,25-dihidroxitamina D y anticuerpos relacionados	
	<130> E0087835-EC	
10	<160> 10	
	<170> PatentIn versión 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
20	<400> 1	
		Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly Met Gln
		1 5 10
	<210> 2	
	<211> 10	
	<212> PRT	
25	<213> Mus musculus	
	<400> 2	
		Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr
30		1 5 10
	<210> 3	
	<211> 9	
	<212> PRT	
35	<213> Mus musculus	
	<400> 3	
		Ser Gly Leu Ile Asp Gly Phe Ala Tyr
40		1 5
	<210> 4	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
45	<400> 4	
		His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn Ile Gly
		1 5 10
	<210> 5	
	<211> 7	
50	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	

ES 2 696 075 T3

<400> 5

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp
1 5

5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

10

<400> 6

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Phe Thr
1 5

15

<210> 7
<211> 110
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala
1 5 10 15

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser
35 40 45

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

Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser
65 70 75 80

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

20

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

25

<210> 8
<211> 330
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 8

ggaggcttag tgcagcctgg aggggtcccgg aaactctcct gtgcagcctc tggattcact 60

ttcagtaact ttggaatgca gtgggttcgt caggctccag agaaggggct agagtgggtc 120

gcatacatca gtagtggcag tagtaccatc tactatgcag acacagtga gggccgattc 180

accatatcca gagacaatcc caagaatacc ctgttcctgc aaatgaccag tctaaggctc 240

gaggacacgg ccatgtatta ctgtgcaaga tcgggtttaa tcgacgggtt tgcttactgg 300

30

ggccaagggga ccacggtcac cgtctcctca 330

<210> 9

ES 2 696 075 T3

<211> 95
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 9

Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile
 1 5 10 15
 Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln
 20 25 30
 Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn
 35 40 45
 Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala
 50 55 60
 Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser
 85 90 95

<210> 10
 <211> 287
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10

<400> 10

15

cagtctccat cctccatgtc tgtatctctg ggagacacag tcagcatcac ttgccatgca 60
 agtcagggca ttagcagtaa tataggggtg ttgcagcaga aaccagggaa atcatttaag 120
 ggcctgatct atcatggaac caacttgga gatggagttc catcaagggt cagtggcagt 180
 ggatctggag cagattattc tctcaccatc agcagcctgg aatctgaaga ttttgagac 240
 tattactgtg tacagtatgc tcagtttcca ttcacgttcg gctcggg 287

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo que se une específicamente al dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD), **caracterizado por que** se une a un complejo formado entre VDR-LBD y 1,25-dihidroxitamina D o un análogo de la misma sin reacción cruzada con VDR-LBD sin complejar.
- 10 **2.** El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2 y 3.
- 3.** El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.
- 15 **4.** El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende las SEQ ID NO: 1, 2 y 3.
- 5.** El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.
- 20 **6.** El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 7 o está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 8.
- 7.** El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 9 o está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 10.
- 25 **8.** El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es una inmunoglobulina completa o un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en F(ab), F(ab'), F(ab')₂, F(v), F(c), F(d), anticuerpos monocatenarios (scFv).
- 30 **9.** Un procedimiento para detectar 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)₂D) o un análogo de la misma en una muestra de fluido biológico, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 35 (i) ajustar el pH de la muestra de fluido biológico a un valor comprendido entre 6 y 9 y añadir simultánea o posteriormente a la muestra de fluido biológico una proteína receptora que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD), obteniendo de este modo la unión de 1,25-dihidroxitamina D o un análogo de la misma al VDR-LBD de la proteína receptora;
- 40 (ii) capturar la proteína receptora que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD) unido a 1,25-dihidroxitamina D o un análogo de la misma por medio de un resto de captura que se une específicamente al dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD), pudiendo unirse dicho resto de captura a un complejo formado entre VDR-LBD y 1,25-dihidroxitamina D o un análogo de la misma sin reacción cruzada con VDR-LBD sin complejar; y
- 45 (iii) detectar la proteína receptora capturada que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD) unido a 1,25-dihidroxitamina D o un análogo de la misma.
- 10.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la proteína receptora es la proteína completa del receptor de la vitamina D o el dominio de unión a ligando (LBD) de la misma en una forma aislada o genomanipulada.
- 50 **11.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que el análogo de la vitamina D es 19-nor-1 α -25-dihidroxitamina D₂, 1 α -hidroxivitamina D₂ o 1 α -hidroxiergocalciferol o 2-metileno-19-nor-(20S)-1 α ,25-(OH)₂D₃.
- 55 **12.** El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el resto de captura es un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 13.** El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el resto de captura se inmoviliza en un soporte sólido.
- 60 **14.** El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que el fluido biológico es sangre completa, plasma, suero u orina.
- 65 **15.** El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que en la etapa (i) el pH de la muestra de fluido biológico se ajusta a un valor comprendido entre 7 y 8,6.

16. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, que es un inmunoensayo de tipo sándwich.
- 5 17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la etapa (iii) de detección de la proteína receptora capturada que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD) unido a 1,25-dihidroxitamina D o un análogo de la misma se lleva a cabo por medio de un anticuerpo detector anti-VDR-LBD marcado.
- 10 18. Un kit para detectar 1,25-dihidroxitamina D o un análogo de la misma en una muestra de fluido biológico, comprendiendo el kit:
- una proteína receptora que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD);
 - 15 - un resto de captura que se une específicamente al dominio de unión a ligando del receptor de la vitamina D (VDR-LBD), pudiendo unirse selectivamente dicho resto de captura a un complejo formado entre VDR-LBD y 1,25-dihidroxitamina D o un análogo de la misma sin reacción cruzada con VDR-LBD sin complejar; y
 - 20 - un tampón de unión que tiene un pH comprendido entre 6 y 9.
19. El kit de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la proteína receptora es la proteína completa del receptor de la vitamina D o el dominio de unión a ligando de la misma en una forma aislada o genomanipulada.
- 25 20. El kit de acuerdo con la reivindicación 18 o 19, en el que el resto de captura es un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 30 21. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que el tampón de unión tiene un pH comprendido entre 7 y 8,6.

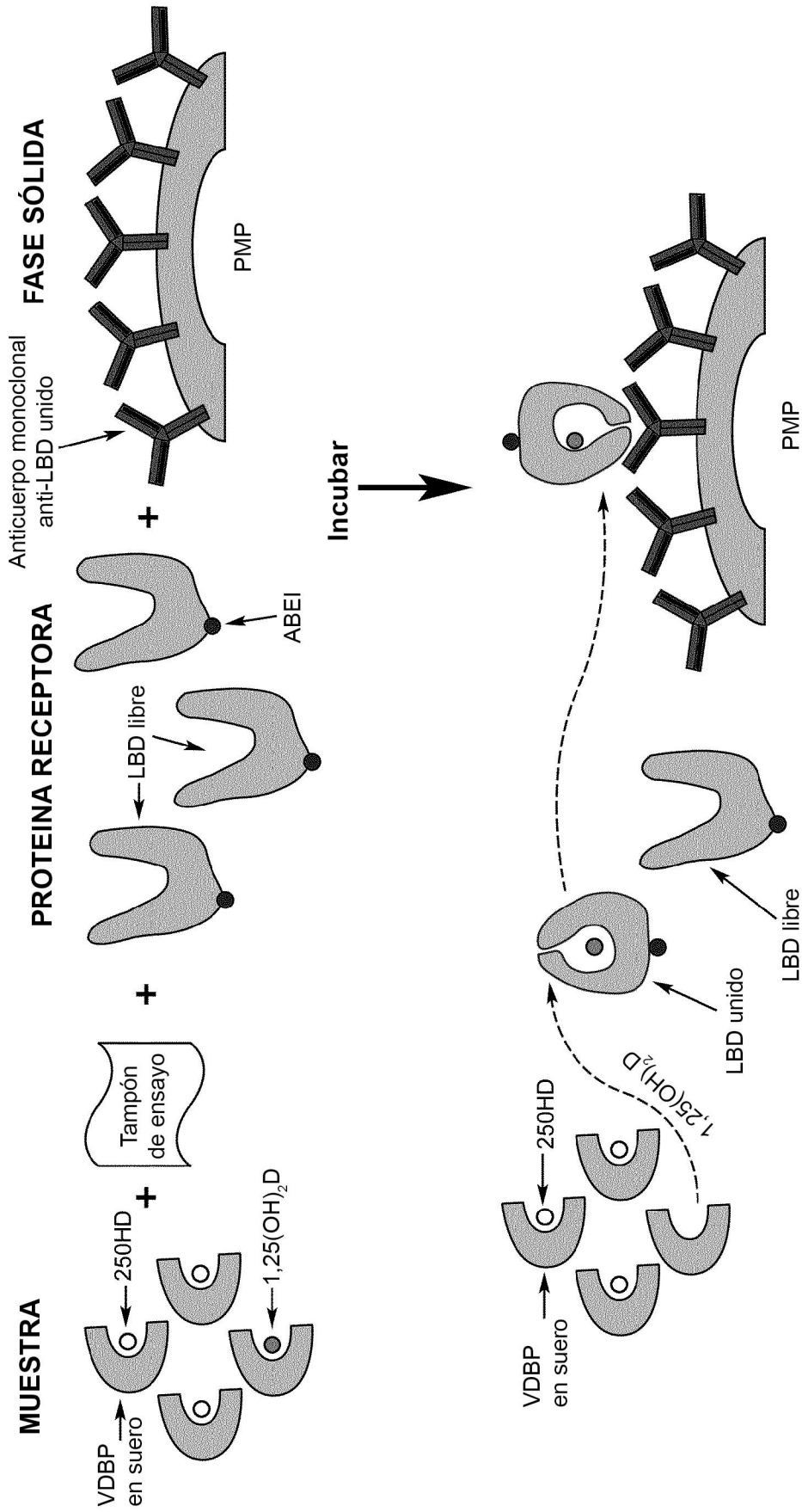


FIG. 1

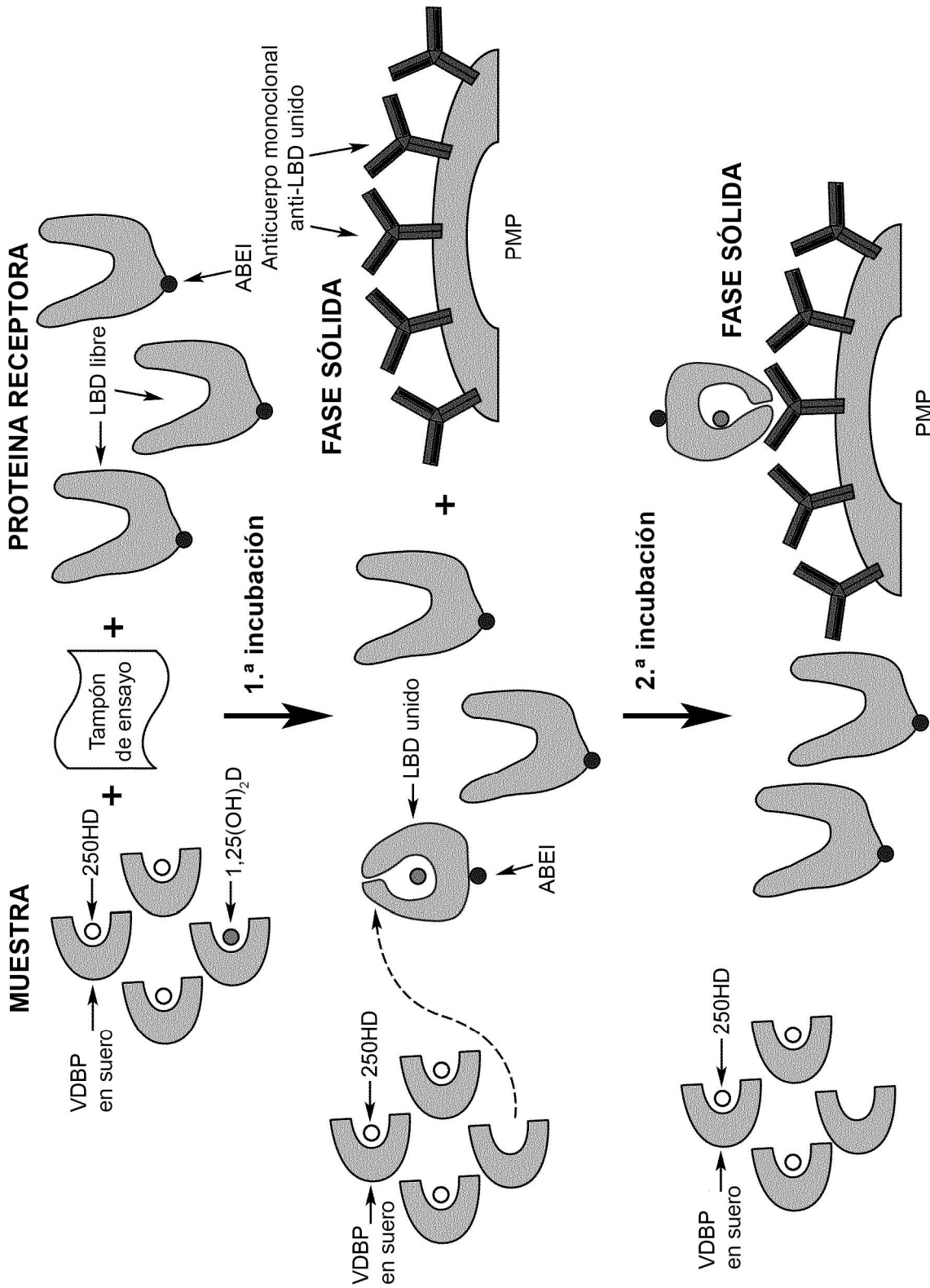


FIG. 2

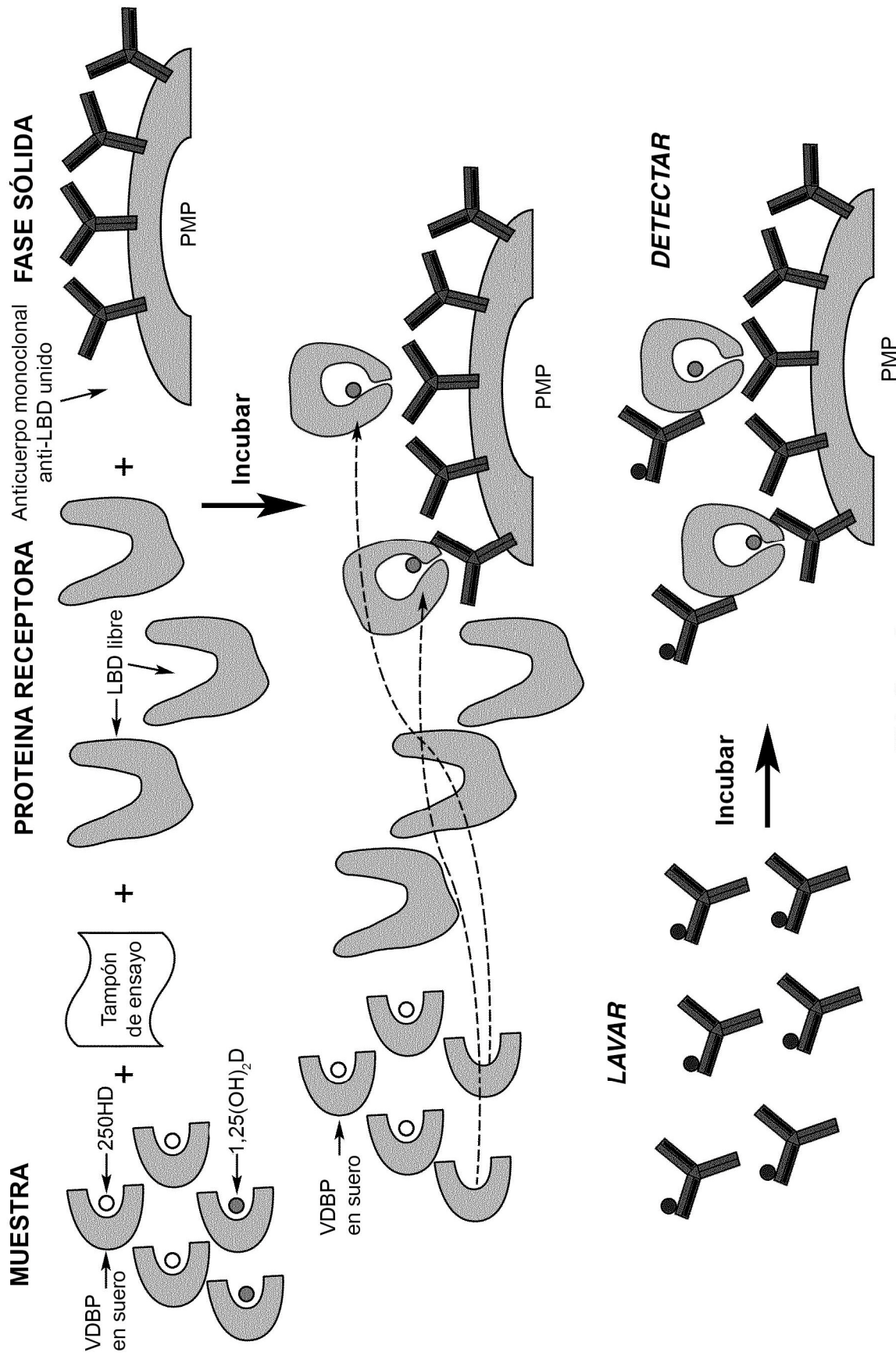


FIG. 3

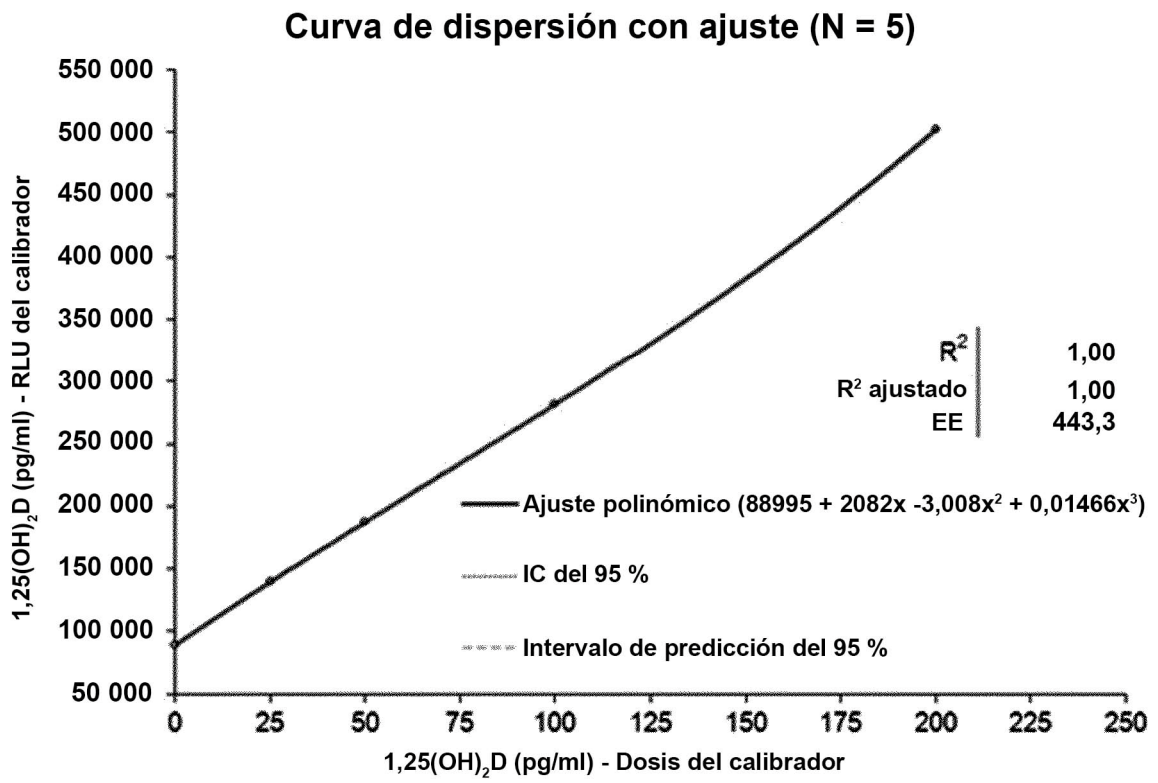


FIG. 4

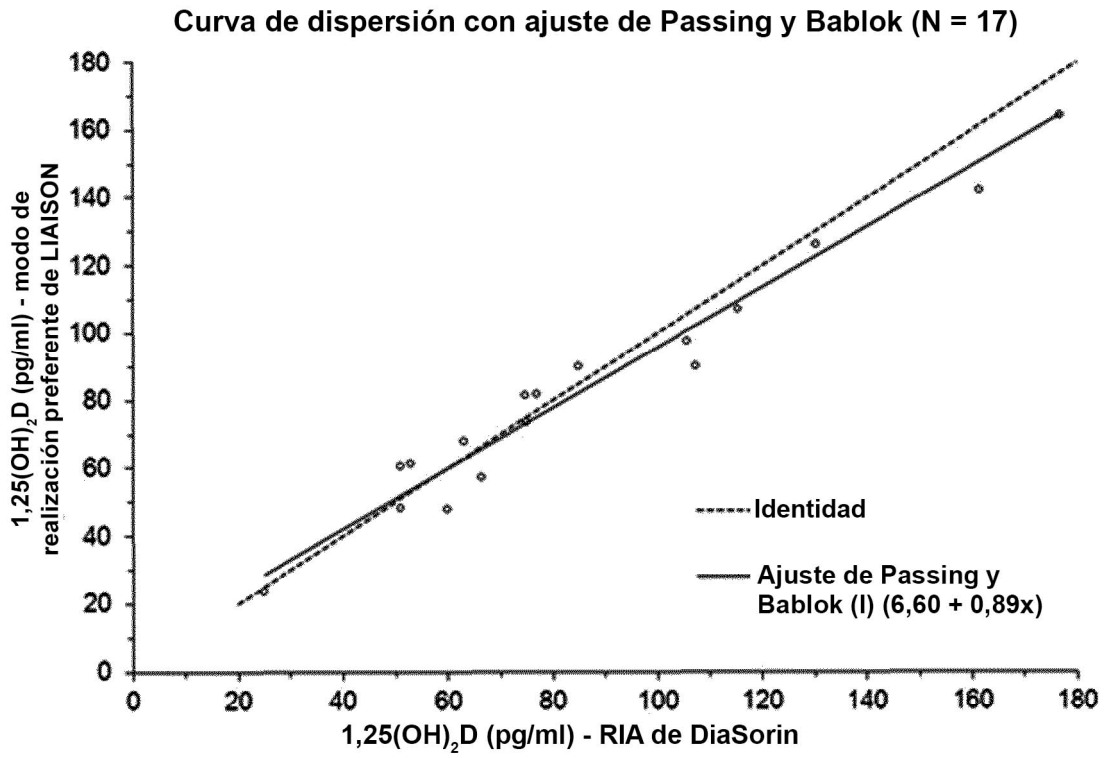


FIG. 5a

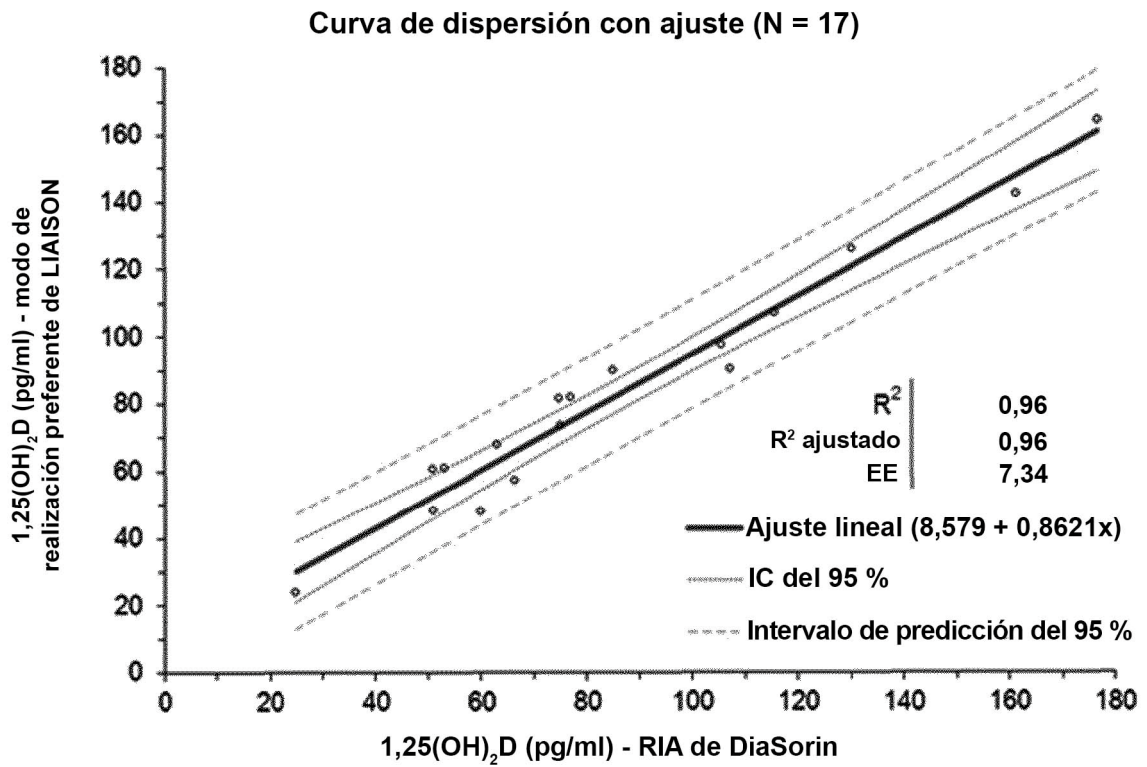


FIG. 5b

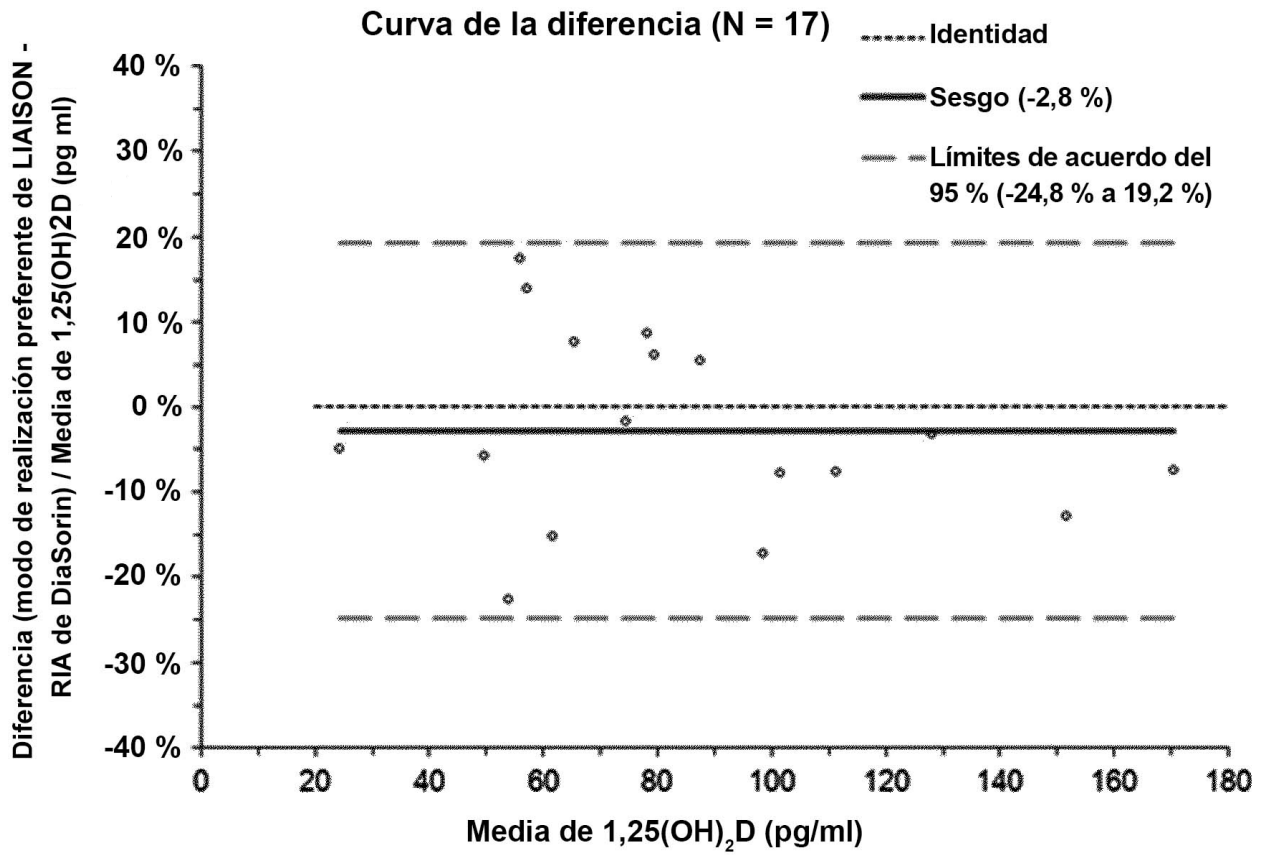


FIG. 5c

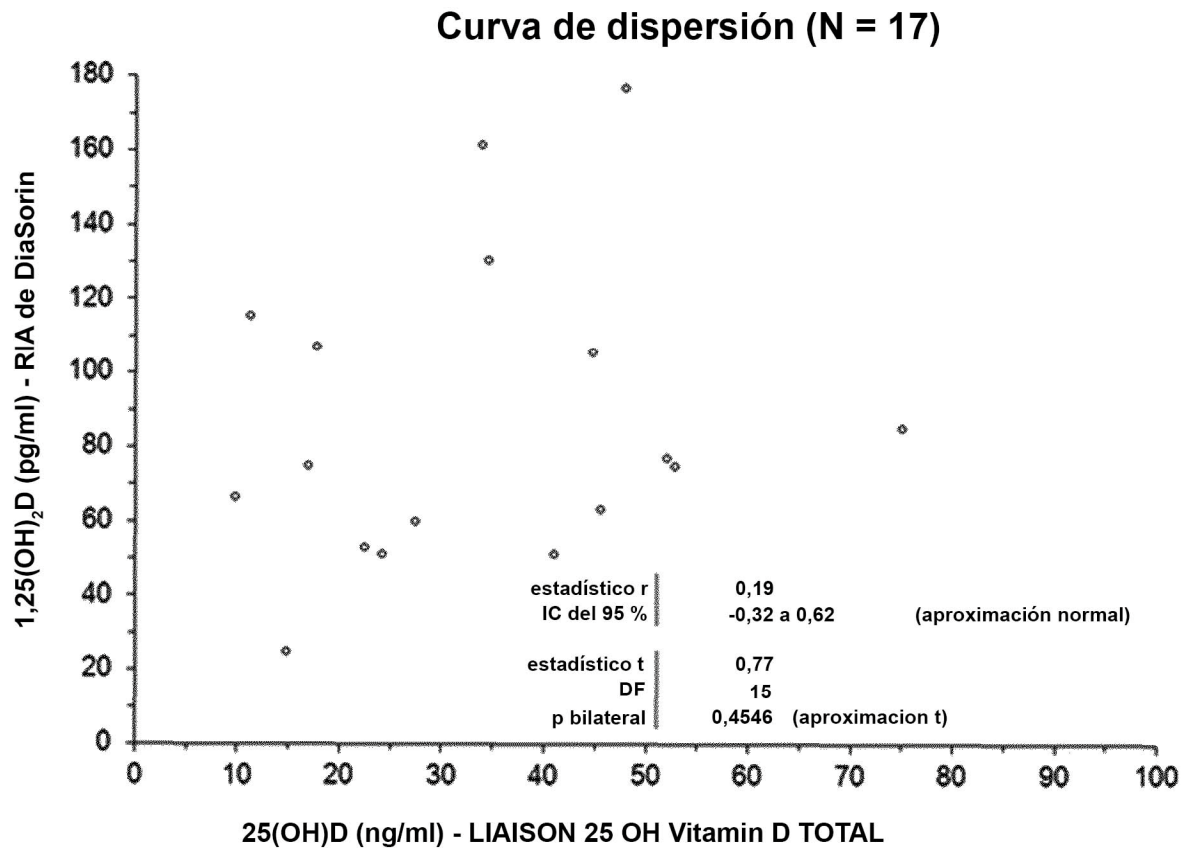


FIG. 6