

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 823**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2014 PCT/EP2014/051482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14114780**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2014 E 14702498 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2948474**

54 Título: **Método y kit para detectar 1,25-dihidroxivitamina D y anticuerpos relacionados**

30 Prioridad:

28.01.2013 EP 13152851

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

27.08.2020

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 2 780 823 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

Método y kit para detectar 1,25-dihidroxitamina D y anticuerpos relacionados

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

Más en particular, la presente invención se refiere a un método y a un kit de inmunoensayo, así como a los anticuerpos relacionados, adecuados para detectar la 1,25-dihidroxitamina D total en una muestra de líquido biológico que puede contener 1,25-dihidroxitamina D junto con otras formas inactivas de vitamina D, tales como 25-hidroxitamina D.

15 La vitamina D es una hormona esteroidea que desempeña un papel fundamental en el metabolismo esquelético y la homeostasis del calcio. En seres humanos y animales, las principales formas de vitamina D son la vitamina D₃ (colecalfiferol) y vitamina D₂ (ergocalciferol). La vitamina D₃ se sintetiza principalmente en la piel a partir de 7-deshidrocolesterol en respuesta a la exposición a los rayos solares ultravioleta B (UVB), pero la ingesta de vitaminas también puede producirse a partir de fuentes alimentarias tales como el pescado azul, 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 a partir de suplementos (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 diferenciadas. En el hígado, la enzima 25-hidroxilasa convierte la vitamina D en 25-hidroxitamina D (denominada a continuación en el presente documento "25(OH)D"). Este metabolito intermedio es la principal forma circulante de la hormona y sirve como reservorio para la hidroxilación adicional al metabolito biológicamente activo 1,25-dihidroxitamina D (denominado a continuación en el presente documento "1,25(OH)₂D").

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

35 Debido a su naturaleza lipófila, la mayoría de la vitamina D y los metabolitos de la misma circulan en el torrente sanguíneo unidos a la proteína de unión a vitamina D (DBP, por sus siglas en inglés) (80-90%), también conocida como globulina Gc, y albúmina (10-20%). La DBP tiene alta afinidad por los metabolitos de la vitamina D (K_a=5x10⁸ M⁻¹ para 25(OH)D y 24,25(OH)₂D, 4x10⁷ M⁻¹ para 1,25(OH)₂D y vitamina D), de modo que en circunstancias normales sólo aproximadamente el 0,03% de 25(OH)D y 24,25(OH)₂D y aproximadamente el 0,4% de 1,25(OH)₂D están 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 de vitamina D (VDR, por sus siglas en inglés) intracelular específico, que actúa principalmente mediante la regulación de la expresión de genes cuyos promotores contienen secuencias de ADN específicas conocidas como elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE, por sus siglas en inglés).

45 El receptor de vitamina D (VDR) es un regulador transcripcional dependiente de ligando que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (NR, por sus siglas en inglés). Al igual que los otros miembros de esta familia de receptores, el VDR posee una estructura modular que comprende un dominio A/B amino-terminal, un dominio de unión a ADN (DBD, por sus siglas en inglés) altamente conservado, una región ligadora flexible y un dominio de unión a ligando (LBD, por sus siglas en inglés) C-terminal que es más variable (Mangelsdorf DJ *et al.*, 1995, Cell 83 (6): 835-9). El LBD C-terminal es un dominio multifuncional globular, responsable de la unión hormonal, la dimerización con el receptor X retinoide (RXR) y la interacción con los correpresores y coactivadores, que en conjunto son críticos 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) del VDR se ha cristalizado y se ha resuelto su estructura (Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Klaholz B, Moras 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 conduce a su vez a la apertura del promotor a la maquinaria transcripcional (Glenville J. *et al.*, 1998 Physiological Reviews 78 (4): 1193-1231).

65 Se sabe que los dominios de unión a ligando (LBD) del receptor nuclear tienen un alto contenido de hélice alfa, que puede experimentar un gran cambio conformacional en respuesta a la unión del ligando, formando una bolsa hidrófoba. Recientemente, se resolvieron las diferencias en la conformación del dominio de unión a ligando de

Rattus norvegicus (r-VDR-LBD, por sus siglas en inglés) cuando se une a diversos ligandos mediante espectroscopía de RMN (Kiran K. Singarapu *et al.* 2011 *Biochemistry* 50 (51): 11015-24).

5 La vitamina D se reconoce actualmente como una prohormona que tiene múltiples papeles en el mantenimiento de una salud óptima en seres humanos. Desde hace mucho tiempo, se ha establecido que una deficiencia marcada de vitamina D produce enfermedades óseas histológicamente evidentes tales como osteomalacia en adultos y raquitismo en niños, mientras que una insuficiencia de vitamina D puede provocar alteraciones en la concentración de hormona paratiroidea que, si persiste en el tiempo, puede contribuir a la pérdida y la fractura óseas. Sin embargo, aunque inicialmente se identificó como un regulador clásico de la homeostasis del calcio, ahora se sabe que la
10 vitamina D tiene un espectro de acciones más amplio, impulsadas por la amplia expresión y distribución en los tejidos humanos del receptor de vitamina D (VDR).

15 En las últimas décadas, los datos clínicos y epidemiológicos han proporcionado varias pruebas de que niveles alterados de 25(OH)D están asociados con un riesgo creciente de diversas enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, hipertensión, infarto de miocardio, diabetes, cáncer, función neuromuscular reducida, enfermedades infecciosas y autoinmunitarias. Incluso las complicaciones del embarazo, tales como la preeclampsia, la diabetes gestacional, la cesárea y el parto prematuro, podrían ser la trágica secuela de deficiencias gestacionales de vitamina D (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).

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

25 Por tanto, la determinación de 1,25(OH)₂D circulante, que es la forma activa de la vitamina D, se está volviendo cada vez más relevante en muchas aplicaciones clínicas diferentes, ya sea como marcador de diagnóstico y/o bien como indicador de monitorización de la terapia. Por ejemplo, la determinación de los niveles séricos de 1,25(OH)₂D y hormona paratiroidea (PTH) y una posible correlación de los mismos pueden representar una medida importante para ayudar en el diagnóstico de enfermedades paratiroideas, así como para la detección de la aparición de
30 hiperparatiroidismo secundario en el transcurso de la insuficiencia renal o el desarrollo de raquitismo resistente a vitamina D (VDRR, por sus siglas en inglés).

Actualmente, tanto en el uso clínico habitual como en el de investigación, existe una amplia variedad de metodologías disponibles para medir los niveles circulantes de 25(OH)D total (es decir, 25(OH)D₃ + 25(OH)D₂).
35 Abbott Diagnostics (Abbott Park, IL, EE.UU., ensayo de vitamina D 25-OH ARCHITECT), DiaSorin Inc. (Stillwater, MN, EE.UU., ensayo LIAISON® 25 OH Vitamin D Total), Immunodiagnostic Systems (Boldon, Inglaterra, IDS-iSYS 25-Hidroxy Vitamin D (25OHD)), Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania, ensayos de vitamina D total Modular Analytics E170 Elecsys®) y Siemens Healthcare Diagnostics (Tarrytown, NY, EE.UU., ensayo de vitamina D total ADVIA Centaur®) proporcionan métodos de inmunoensayo comerciales, rápidos y automatizados basados en
40 quimioluminiscencia. Además de estas plataformas de ensayo, recientemente ha habido un aumento constante en el uso de métodos físicos basados en separación cromatográfica seguida de detección directa no inmunológica (cromatografía líquida semiautomática-espectrometría de masas en tándem, CL-EM/EM), 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),
45 Europa (por ejemplo, la Universidad de Gante en Gante, Bélgica, y CHU de Lieja en Lieja, Bélgica) y Australia (por ejemplo, Pathology Queensland en Herston Queensland, y Douglass Hanly Moir Pathology en Macquarie Park NSW).

50 A pesar de la amplia selección de plataformas de ensayo para medir 25(OH)D, no hay métodos de ensayo automatizados disponibles actualmente para la determinación cuantitativa de la forma activa de la vitamina D en muestras clínicas. Los niveles circulantes sistémicos de 1,25(OH)₂D son extremadamente bajos, en el intervalo de pg/ml, y por tanto representan un desafío bioanalítico significativo para la monitorización clínica. La cuantificación de 1,25(OH)₂D en plasma se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). Para evitar problemas relacionados con el manejo de la radiactividad y la vida útil limitada de los marcadores radiactivos, recientemente han surgido nuevos métodos de prueba de vitamina D que se basan principalmente en el
55 empleo de la metodología CL-EM/EM. Sin embargo, los ensayos bioanalíticos de CL-EM/EM notificados para 1,25(OH)₂D sufren de los extensos procedimientos de preparación de muestras o protocolos de derivatización que deben llevarse a cabo con el fin de lograr la sensibilidad y selectividad requeridas. En la actualidad, los principales métodos disponibles para la detección de 1,25(OH)₂D requieren la realización de varias etapas de tratamiento previo o de análisis previo de la muestra que habitualmente se llevan a cabo de manera manual y, por tanto, pueden
60 requerir mucho tiempo, mano de obra y son costosos.

65 El documento EP 0 583 945 A da a conocer un ensayo para 1,25(OH)₂D, que consiste en extraer suero sanguíneo usando un disolvente orgánico tal como acetato de etilo, separando otros metabolitos de vitamina D potencialmente interferentes, usando una columna de sílice y luego añadir proteína receptora de cerdo, 1,25(OH)₂D radiomarcada, anticuerpo biotinilado que puede unirse al receptor, y una proteína facilitadora tal como BSA como parte de un

ensayo de unión competitiva por inmunoprecipitación.

El documento WO/8901631 da a conocer 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 puede unirse al receptor de suero sanguíneo no tratado. El ensayo de unión competitiva requiere el uso de proteína transportadora de vitamina D que actúa como una pantalla para minimizar la interferencia de los metabolitos relacionados.

S. SWAMI *et al.*, Bone, vol. 28, n.º 3, marzo de 2001: 319-326 dan a conocer un anticuerpo que se une a la porción de región bisagra del receptor de vitamina D (VDR) y que se usa en un método para la medición de VDR. Sin embargo, tal anticuerpo no puede distinguir entre el VDR ocupado por ligando y el VDR no ocupado y, por tanto, no es útil para la detección de 1,25(OH)₂D.

A. STAAL *et al.*, Molecular Endocrinology, vol. 10, n.º 11, 1996: 1444-1456 dan a conocer dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio de unión a ligando del receptor de vitamina D (VDR-LBD, por sus siglas en inglés), junto con dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio de unión a ADN de este receptor (VDR-DBD, por sus siglas en inglés). Sin embargo, estos anticuerpos monoclonales sólo pueden distinguir selectivamente a través de distintos cambios conformacionales que se producen en la molécula de VDR en función de la secuencia de nucleótidos específica a la que se une el receptor y no pueden distinguir entre VDR unido a ligando y no unido.

El RIA de DiaSorin (parte n.º 65100E/100 tubos; 1,25-dihidroxivitamina D) implica el uso de disolventes orgánicos, instrumentación de extracción y columnas C18-OH para separar metabolitos de vitamina D potencialmente interferentes tales como 24,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D y 25(OH)D con el fin de aislar 1,25(OH)₂D de la muestra de prueba antes de la medición del metabolito. Incluso el ensayo automatizado comercializado recientemente proporcionado por Immunodiagnosics para la determinación de 1,25(OH)₂D (parte n.º IS-2400; IDS-iSYS 1,25-dihidroxivitamina D) requiere una etapa de tratamiento previo de muestra intensiva que requiere mucho tiempo y trabajo, que usa las inmunocápsulas patentadas de IDS.

Además, los métodos de la técnica anterior a menudo sufren de limitaciones en cuanto a la especificidad del ensayo ya que los acontecimientos de reactividad cruzada con otros metabolitos de vitamina D no eliminados por completo de las muestras de prueba durante las etapas de análisis previo o de tratamiento previo de la muestra pueden conducir a la medición de concentraciones más altas de 1,25(OH)₂D erróneas. Por ejemplo, la mayoría de los anticuerpos de inmunoensayos reaccionan significativamente de forma cruzada 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 1,25(OH)₂D.

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

En particular, existe la necesidad de un método de ensayo que permita la detección precisa, sensible y exacta de 1,25(OH)₂D total (1,25(OH)₂D₂ + 1,25(OH)₂D₃) sin requerir etapas de tratamiento previo de muestra que requieren mucho tiempo y mano de obra, y que posiblemente puedan proporcionarse en un formato automatizado.

También existe la necesidad de un método de ensayo de 1,25(OH)₂D que sustancialmente no reaccione de forma cruzada con otros metabolitos de vitamina D que pueden estar presentes en la muestra de prueba.

Estas y otras necesidades se satisfacen mediante el método, y el kit y los anticuerpos relacionados, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, que forman parte integral de la descripción.

Tal como se ilustra adicionalmente en los ejemplos a continuación, la presente invención se basa en el hallazgo 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 vitamina D (VDR-LBD) a 1,25(OH)₂D.

Más específicamente, los resultados de los experimentos llevados a cabo por los presentes inventores mostraron claramente que un cambio en el valor de pH de la muestra de prueba por encima de 6, preferiblemente por encima de 7, induce sorprendentemente un aumento de aproximadamente 200 veces en la afinidad de VDR-LBD por 1,25(OH)₂D con respecto a 25(OH)D, mientras que al mismo valor de pH, DBP presenta una afinidad aproximadamente 1000 veces mayor por 25(OH)D con respecto a 1,25(OH)₂D. Por tanto, la explotación de un efecto tan ventajoso del pH sobre el equilibrio entre 1,25(OH)₂D unida a DBP y 1,25(OH)₂D unida a VDR-LBD representa una herramienta única en cuanto a tanto facilidad como eficacia para capturar selectivamente 1,25(OH)₂D circulante de DBP natural en presencia de un exceso molar de VDR-LBD, dejando al mismo tiempo la mayoría de 25(OH)D en forma secuestrada unida a DBP. Un enfoque de este tipo es particularmente ventajoso con respecto a los métodos de la técnica anterior, que requieren etapas de tratamiento previo de la muestra que requieren mucho tiempo y mano de obra para permitir la determinación de 1,25(OH)₂D en muestras clínicas.

Dado que se conoce que la unión de 1,25(OH)₂D a VDR-LBD induce un cambio conformacional en la molécula de VDR-LBD, los presentes inventores han llevado a cabo una amplia experimentación para desarrollar un resto de captura, específicamente un anticuerpo, que puede reconocer y unirse específicamente a VDR-LBD unido a

1,25(OH)₂D sin reacción cruzada con VDR-LBD sin complejar, con el fin de discriminar selectivamente el complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D del VDR-LBD no unido en diversas matrices biológicas. Tal anticuerpo de captura específico de conformación es particularmente útil, ya que representa una herramienta invaluable para la detección rápida y fiable de la forma activa circulante de vitamina D.

5 Por tanto, un aspecto de la presente invención es un método para detectar 1,25(OH)₂D o un análogo de la misma en una muestra de líquido biológico, tal como se define en la reivindicación 5 adjunta.

10 También dentro del alcance de la invención, hay un kit para detectar 1,25(OH)₂D o un análogo de la misma en una muestra de líquido biológico, tal como se define en la reivindicación 13 adjunta.

15 El término "vitamina D" tal 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 los mismos, tales como, por ejemplo, 19-nor-1 α -25-dihidroxitamina D₂ (por ejemplo, Zemplar 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).

20 Tal como se mencionó anteriormente, una característica del método de detección de la presente invención es que el pH de la muestra de líquido biológico a examen se ajusta a un valor por encima de 6, es decir, comprendido entre 6 y 9. Los valores de pH preferidos 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 expertos en la técnica conocen bien los agentes tamponantes y las disoluciones de tampón adecuados para ajustar el pH de una muestra de líquido biológico a los valores mencionados anteriormente.

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

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

35 El término "proteína receptora que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de vitamina D (VDR-LBD)" tal como se usa en la presente descripción abarca tanto la proteína receptora de vitamina D (VDR) completa, que incluye el dominio de unión a ligando C-terminal, como el dominio de unión a ligando (LBD) del receptor de vitamina D en forma aislada o modificada por ingeniería genética. Por ejemplo, la proteína receptora de vitamina D completa 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 para el receptor de vitamina D de diversas especies animales están disponibles y caracterizadas. Por tanto, la proteína receptora de vitamina D completa o el dominio de unión a ligando de la misma usada en la presente invención como proteína receptora es, por ejemplo, pero sin limitación, de origen mamífero (por ejemplo, una proteína humana, de ratón o de rata), o de origen aviar, o de origen anfibio; alternativamente, es una variante mutada de cualquiera de tales proteínas.

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

50 Por tanto, en una realización preferida de la presente invención, la proteína receptora de vitamina D completa o el dominio de unión a ligando de la misma usada como proteína receptora es una proteína de fusión recombinante etiquetada con His. Sin embargo, pueden emplearse 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 epítipo se conocen generalmente en la técnica. En otra realización preferida, la proteína receptora de vitamina D completa o el dominio de unión a ligando de la misma usada 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 de la proteína. También puede emplearse una proteína receptora (es decir, la proteína receptora de vitamina D completa o el dominio de unión a ligando de la misma, posiblemente acoplada a una etiqueta de afinidad o una chaperona o proteína similar a chaperona) que porta una mutación de secuencia de aminoácidos con el objetivo de mejorar la estabilidad en el

contexto de la invención.

Tal como se mencionó anteriormente, el método de detección de la presente invención implica el uso de un anticuerpo monoclonal tal como se define en la reivindicación 1 adjunta.

5 Dado que los presentes inventores 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 está dentro del alcance de la presente invención.

10 Por tanto, otro aspecto de la invención es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al dominio de unión a ligando del receptor de vitamina D de un complejo formado entre VDR-LBD y 1,25-dihidroxivitamina D, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende las CDR SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y el dominio variable de cadena ligera comprende las CDR SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

15 El anticuerpo monoclonal de la invención, así como el kit y el método basado en el mismo, resuelve el problema técnico de discriminar selectivamente el complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D de VDR-LBD no unido.

20 Tal como se describe en los ejemplos, los presentes inventores produjeron varios clones de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales que pueden reconocer específicamente y unirse al VDR-LBD conformacionalmente modificado unido a 1,25(OH)₂D sin reacción cruzada sustancial con VDR-LBD sin complejar. Uno de tales clones de hibridoma, denominado 11B4H11H10, produce un anticuerpo monoclonal que se caracterizó completamente mediante secuenciación, con el fin de identificar las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos 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.

25 Tales secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos se ilustran en la lista de secuencias, que forma parte integral de la descripción; en la lista de secuencias, las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico del dominio variable de cadena pesada de 11B4H11H10 se denominan SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente; las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico del dominio variable de cadena ligera de 11B4H11H10 se denominan SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, respectivamente; las CDR del dominio variable de cadena pesada de 11B4H11H10 se denominan SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y las CDR del dominio variable de cadena ligera de 11B4H11H10 se denominan SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

30 En una 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.

40 El término "anticuerpo" tal como se usa en la presente descripción abarca una molécula de anticuerpo completa así como un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno. Un "fragmento de anticuerpo" incluye cualquier fragmento de inmunoglobulina que tenga la misma especificidad de unión que el anticuerpo completo correspondiente. Tales fragmentos se producen según métodos convencionales; véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, Estados Unidos, 1988. Los ejemplos no limitativos de fragmentos de anticuerpos incluyen F(ab), F(ab')₂, F(v), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), F(d).

45 El anticuerpo de la presente invención se produce preferiblemente mediante inmunización animal. En resumen, los anticuerpos monoclonales se generan inyectando animales, por ejemplo ratas, hámsteres, conejos o ratones, con un inmunógeno que comprende el VDR-LBD conformacionalmente modificado unido a vitamina D 1,25-(OH)₂ o un análogo de la misma, según métodos conocidos *per se* (Costagliola *et al.*, J Immunol 1998; 160: 1458-65). La presencia de producción de anticuerpos específicos se controla 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 se encuentra 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 luego se seleccionan por su capacidad para secretar el/los anticuerpo(s) de interés, es decir, anticuerpos que se unen específicamente al VDR-LBD del complejo formado entre VDR-LBD y 1,25(OH)₂D o un análogo de la misma.

50 En el método de detección de la presente invención, la detección del complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D capturado puede lograrse mediante una amplia variedad de técnicas. Por ejemplo, puede generarse una señal detectable directamente empleando una proteína receptora marcada o indirectamente a través de una molécula detectora marcada que puede unirse al complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D capturado por el anticuerpo de captura. Normalmente, 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 anticuerpo monoclonal de la invención (es decir, un anticuerpo detector anti-VDR-LBD).

65 El marcador detectable puede ser cualquier sustancia que puede producir una señal que es 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 la detección colorimétrica, proteínas de unión, epítopos, enzimas o sustratos. En la práctica, puede incorporarse cualquier molécula o marcador señal conocido en la técnica en realizaciones del método y el kit de la presente invención.

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

Según una realización preferida, el método de detección de la invención es un inmunoensayo *in vitro* realizado en una muestra de líquido biológico de un sujeto o paciente. Los inmunoensayos incluyen ensayos tanto homogéneos como heterogéneos, así como ensayos tipo sándwich competitivos y no competitivos.

Las figuras 1 y 2 ilustran, a modo de ejemplo, inmunoensayos no competitivos de un sitio según la invención, en los que el complejo formado mediante la unión de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a la proteína receptora marcada que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de vitamina D (VDR-LBD) se captura por el anticuerpo de captura específico de conformación de la invención (que en las figuras 1 y 2 se denomina "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, por sus siglas en inglés) y el marcador es amino-butil-etil-isoluminol (ABEI).

En la realización específica de la figura 1, la etapa de ajustar el pH de la muestra de líquido 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 la realización específica de la figura 2, tales etapas se llevan a cabo secuencialmente.

La figura 3 ilustra, a modo de ejemplo, un inmunoensayo tipo sándwich. Las características y los procedimientos generales de los inmunoensayos tipo sándwich están bien establecidos y se conocen por el experto en la técnica. Un inmunoensayo tipo sándwich es una realización particularmente preferida del método de la presente invención.

El inmunoensayo tipo sándwich de la figura 3 implica la unión del complejo VDR-LBD/ $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ al anticuerpo de captura específico de conformación (denominado "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 o bien está marcado directamente o bien se reconoce 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). Luego se mide la cantidad de anticuerpo marcado unido directa o indirectamente al complejo VDR-LBD/ $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ mediante medios adecuados.

El inmunoensayo tipo sándwich puede implicar el uso de una proteína receptora etiquetada que comprende VDR-LBD en combinación con un anticuerpo detector anti-etiqueta. En esta realización, la detección del complejo VDR-LBD/ $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ capturado por el anticuerpo de captura específico de conformación se logra mediante la unión específica del anticuerpo detector a la etiqueta que está presente en el complejo. Preferiblemente, la etiqueta es una etiqueta de polihistidina. En una realización más específica, 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 de quimioluminiscencia o fluorescencia, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), matrices de perlas a base de Luminex, ensayos de microalineamiento de proteínas o formatos de prueba rápida tales como, por ejemplo, pruebas de tiras inmunocromatográficas.

En función del formato del inmunoensayo, el anticuerpo de captura y/o el anticuerpo detector pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido. Los 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, Sepharose quelante o perlas magnéticas, membranas, tiras o chips.

Tal como se mencionó anteriormente, un aspecto adicional 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 líquido biológico, comprendiendo el kit la proteína receptora y el anticuerpo de captura tal como se definió anteriormente en relación con el método, así como un tampón de unión que tiene un pH comprendido entre 6 y 9. Los valores de pH preferidos 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 preferidos pero no limitativos del tampón de unión para ajustar el pH de la muestra de prueba 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 súper paramagnéticas, una placa de microtitulación, una cubeta, un dispositivo de flujo lateral, una celda de flujo o cualquier superficie en la que puede unirse una proteína o un péptido de manera pasiva o covalente. Puede inmovilizarse o bien la proteína receptora o bien el anticuerpo de captura del kit de la invención

sobre el soporte sólido.

Además, el kit de la invención puede contener medios de detección tal como se describió anteriormente en relación con el método de detección.

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

10 Ejemplos

10 Ejemplo 1: expresión y purificación de la proteína VDR-LBD de rata

Con el fin de producir proteínas VDR-LBD recombinantes que van a usarse como reactivos adecuados para los métodos y kits de la invención, se construyó un vector de expresión a base de plásmido. En resumen, se clonó el ADN que codifica para el dominio de unión a ligando del receptor de vitamina D de los residuos 116-423 de *Rattus norvegicus* con delección de un bucle interno de 47 aminoácidos (165-211) (rVDR-LBD) en el plásmido pET-29b (Novagen) usando la combinación de sitio de restricción Nde I/Bgl II. Para facilitar la detección y purificación de la proteína VDR-LBD recombinante, puede añadirse una etiqueta de polihistidina en el extremo C-terminal de la proteína de interés clonando una secuencia de codificación de la etiqueta His en el sentido 3' de la secuencia de codificación de VDR-LBD, seguido de un codón de parada.

25 Los plásmidos que codifican para la proteína VDR-LBD se expresaron como cuerpos de inclusión en células BL21-Codon-Plus(DE3)-RIPL (Stratagene) hechas crecer en LB complementado con kanamicina (40 µg/l) y cloranfenicol (40 µg/l). Se inoculó un cultivo iniciador (5 ml) con una única colonia bacteriana y se hizo crecer en un tubo de 14 ml a 37°C (250 rpm) durante 6 horas para alcanzar una densidad óptica (DO600) de ~1. El cultivo iniciador se diluyó en un cultivo nocturno (35 ml) 2500 veces y se hizo crecer en un matraz de 125 ml a 30°C (250 rpm) durante 15 h (DO600 típica ~3,7). El cultivo nocturno se diluyó en 0,5 l de los medios de expresión en un matraz de 2 l con DO600 de ~0,09. El cultivo creció durante ~2,5 h (250 rpm) hasta una DO600 de 0,6-0,8 y se indujo la expresión de VDR-LBD mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,35 mM. El cultivo continuó creciendo a 37°C durante 6 h antes de que las células se recogieran por centrifugación a 5000 rpm (rotor GS3) a 4°C durante 15 min. El sedimento celular recién recogido (normalmente 5,5 g/l de cultivo) se almacenó a -80°C para una purificación de proteínas adicional.

35 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, incluyendo los restos celulares y los cuerpos de inclusión, se obtuvo por centrifugación a 11000 rpm (rotor SS34) a 4°C durante 15 minutos, y se lavó con 200 ml de 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, se agitó suavemente la suspensión durante 5 minutos y luego se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El sedimento final se suspendió muy suavemente en 200 ml de tampón desnaturalizante que contenía Tris-ácido acético 40 mM (pH 7,6), EDTA 2 mM, guanidina-HCl 6 M y DTT 100 mM, y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Se obtuvo una disolución transparente por centrifugación a 12000 rpm a 4°C durante 20 min. Se dializó el sobrenadante contra 20 l de tampón de diálisis que contenía NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 7,4), KCl 50 mM y DTT 2 mM a 4°C durante la noche. Al día siguiente, se retiró el precipitado blanco por 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. Se concentró la disolución de proteína en un filtro de centrifuga Amicon (punto de corte de PM de 10 K) 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 retirar el DTT que es incompatible con las perlas de etiqueta His. Se analizó la pureza de la proteína mediante SDS-PAGE al 12%. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford usando BSA como patrón (coeficiente de 0,055 µg⁻¹ cm⁻¹). El rendimiento típico de VDR-LBD es de 25-30 mg/l de cultivo y depende en gran medida del nivel de expresión, que se determina por la salubridad del cultivo y el procedimiento de diálisis.

55 Ejemplo 2: generación de anticuerpos monoclonales específicos de conformación que pueden reconocer el complejo VDR-LBD/1,25(OH)₂D

60 La estrategia seguida por los presentes inventores para la generación de anticuerpos específicos de conformación se basó en la explotación del complejo que consiste en el dominio de unión del receptor de 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, se fusionaron linfocitos de bazo de ratón con células de mieloma de ratón SP2/0 usando polietilenglicol (PEG) como agente de fusión. Las células híbridas se sembraron en placa sobre 384 pocillos en un formato de placa de cultivo de 96 pocillos de alto rendimiento.

65 La actividad inmunitaria específica de antígeno se determinó mediante ELISA directamente sobre 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 vitamina D no unido solo como control negativo. En resumen, se recubrieron las placas de microtitulación de 96 pocillos con 100 µl de proteína VDR-LBD recombinante 0,56 µg/ml etiquetada con His en forma no unida o unida previamente 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 tres molar de 1,25(OH)₂D (1 mg/ml).

5 La adsorción de proteínas sobre las placas de microtitulación se logró mediante interacciones específicas entre la etiqueta de polihistidina y un recubrimiento de iones de níquel presente en la superficie de los pocillos. Después de la adsorción de proteínas, se lavaron las placas con PBS-T (Tween 20 al 0,1% en PBS) y se incubaron con 100 µl de los anticuerpos monoclonales a examen diluidos 1:16000, durante 1 hora a temperatura ambiente, con mezclado suave. Tras la incubación, se lavaron las placas tres veces con PBS-T y se incubaron con 100 µl de anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra conjugados con HRP (1 mg/ml) diluidos 1:30000 en PBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas lavadas se incubaron luego con 100 µl/pocillo de sustrato TMB a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 150 µl/pocillo de disolución de HCl al 1%. La absorbancia a 450 nm se midió usando un lector de microplacas.

15 Tal estrategia de cribado permitió la detección y selección de clones secretores de 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, se clonaron los hibridomas seleccionados mediante el método de dilución limitante y volvieron a seleccionarse según el método de ELISA descrito anteriormente. Los clones con el título y la especificidad deseados se subclonaron con el fin de estabilizar la expresión del anticuerpo.

20 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 escala de producción. Tras la expansión del clon, se aislaron las IgG de ratón mediante purificación por afinidad de proteína A usando AKTAprime plus y se sometieron a un intercambio de tampón usando una columna de desalación Hitrap para tampón DPBS IX. La muestra de anticuerpo así obtenida 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.

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

30 Tabla 1

(Datos de cribado de 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		Razón
	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

35 El método de selección ilustrado anteriormente también puede usarse para identificar clones de hibridoma adicionales que secretan anticuerpos según la presente invención, es decir, AcM o fragmentos funcionales de los mismos que pueden unirse específicamente al dominio de unión a ligando del receptor de vitamina D unido a 1,25-dihidroxi-vitamina D o un análogo de la misma.

Ejemplo 3: identificación de la secuencia consenso de ADN del gen de VH y VL de inmunoglobulina G, expresada por el clon de hibridoma 11B4H11H10

40 Se descongeló y expandió un vial de disolución madre maestra de 11B4H11H10 para generar un número representativo de células para construcciones de bibliotecas de ADNc. En resumen, se aislaron 1 x 10⁷ células de hibridoma de un cultivo de células de crecimiento logarítmico activo 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. Se aisló el ARN total usando reactivo TRIzol®, Invitrogen, y se cuantificaron en un dispositivo Nanodrop™. Se transcribió de manera inversa el ARN total de hibridoma (500 ng) usando el procedimiento de cebador oligo dT. Se amplificaron las cadenas pesada variable (Vh) y ligera variable (Vl) de inmunoglobulina de ratón de la biblioteca de ADNc (RT-PCR) usando cebadores específicos. Esas cadenas amplificadas se insertaron independientemente, en una orientación aleatoria, en un vector TOPO (Invitrogen) mediante clonación de TA. El producto de ligación se transformó mediante electroporación en una cepa de mantenimiento electrocompetente de *E. coli*.

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

ADN purificados tanto para Vh como para VI.

5 Cada uno de los veinte plásmidos TOPO iniciales de Vh y VI se cribó mediante secuenciación automática de ADN (Functional Biosciences, Madison, Wisconsin) con una única reacción de replicación directa (5'-3') usando 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, indicando de ese modo que la población de hibridoma en el momento de aislamiento de ARN era monoclonal.

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

15 Se realizaron alineaciones de ADN usando el banco de trabajo CLC con el fin de generar la novedosa secuencia consenso pesada variable y ligera variable de inmunoglobulina de ratón. Tras la traducción de las secuencias consenso de ADN identificadas en tramos de aminoácidos, se empleó NCBI BLAST para el análisis del dominio de proteína de Vh y VI para confirmar que las secuencias son genes de inmunoglobulina de ratón y para mapear dominios estructurales importantes, incluyendo las regiones determinantes de complementariedad (CDR).

20 Las secuencias consenso de ADN del anticuerpo monoclonal denominado 11B4H11H10, así como las CDR del mismo, se ilustran en la lista de secuencias.

Ejemplo 4: ensayo de 1,25(OH)₂D

25 Una de las realizaciones preferidas del ensayo de la invención se desarrolló de la siguiente manera. 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 tal como se describe en el ejemplo 1, y se acopló a una etiqueta de afinidad (denominada a continuación en el presente documento "TAG"). El anticuerpo monoclonal 11B4H11H10 que se usó en el ensayo se preparó tal como se describe en el ejemplo 2.

30 Se conjugó un anticuerpo monoclonal anti-TAG de ratón con amino-butil-etil-isoluminol cíclico (cABEI, por sus siglas en inglés) en tampón PBS pH 7,4. La incorporación de cABEI calculada fue de 2-3 moléculas por molécula de anticuerpo. Se prepararon calibradores añadiendo diferentes concentraciones de una disolución etanólica de 1,25(OH)₂D en suero humano libre de esteroides, depurado con carbón. 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 suero de ratón al 1% para

35 mitigar las interferencias heterófilas de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA, por sus siglas en inglés).

Un desafío principal de un ensayo automatizado que no usa ninguna etapa de tratamiento previo de la muestra/análisis previo fuera de línea es la capacidad del ensayo para capturar y detectar específicamente la cantidad de 1,25(OH)₂D total, o análogos de la forma activa de la vitamina D, en una matriz biológica (por ejemplo, suero o plasma) sin interferencia de otros metabolitos de la vitamina D tales como 25(OH)D, 24,25(OH)₂D y 25,26(OH)₂D que pueden estar presentes a niveles 1000 veces mayores que 1,25(OH)₂D. Este desafío se complica además por la presencia de proteínas de unión a vitamina D (DBP) y albúmina, que abundan en la circulación y sirven como principales proteínas de unión para 25(OH)D, 1,25(OH)₂D y otros metabolitos de la vitamina D, mediante lo cual del 85% al 90% se une a DBP y del 10 al 15% a albúmina. Además, los niveles de DBP aumentan hasta 2-5 veces en estados con altos niveles de estrógeno, tales como el embarazo.

45

Por tanto, con el fin de verificar la capacidad del ensayo de la invención para capturar y detectar específicamente la cantidad de 1,25(OH)₂D circulante total de manera independiente de VDBP, los inventores prepararon un panel de muestras de suero humano (N = 17; 8 individuos aparentemente sanos y 9 mujeres embarazadas) que abarca el intervalo de medición del ensayo. Los valores de 1,25(OH)₂D esperados (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. (parte n.º 65100E/100 tubos; 1,25-dihidroxivitamina D), que luego se usó como método de referencia.

50

El ensayo ilustrado esquemáticamente en la figura 3 se llevó a cabo en el analizador LIAISON® de DiaSorin (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 añadieron 20 µl de PMP recubiertas con anticuerpo monoclonal 11B4H11H10 y se incubó la mezcla de reacción durante 30 minutos adicionales. Después de lavar la mezcla de reacción, se añadieron 40 µl de anticuerpo monoclonal anti-TAG conjugado con cABEI y se incubó la mezcla de reacción durante 30 minutos adicionales. Después de un segundo lavado, se añadieron disoluciones desencadenantes y se leyó la mezcla de reacción como unidades relativas de luz (URL) en la cámara de lectura del analizador.

60

Para comparar el ensayo de 1,25(OH)₂D de la invención con el RIA de DiaSorin como método de referencia, se transformaron las URL obtenidas con cada muestra en pg/ml en función de las URL frente a la dosis (pg/ml) obtenidas con la curva de calibración ilustrada en la figura 4. La curva de calibración de la figura 4 se obtuvo de la siguiente manera. Se prepararon calibradores de curva de calibración añadiendo diferentes concentraciones de una

65

disolución etanólica de 1,25(OH)₂D en un suero humano libre de esteroides, depurado con carbón. La respuesta del calibrador (URL) se representó gráficamente frente a la dosis (pg/ml) usando un diagrama de dispersión con ajuste polinómico de tercer orden. Luego, se transformaron las URL de muestra en pg/ml (tabla 2) y se llevó a cabo la correlación entre el ensayo y el método de referencia usando ajuste de Passing & Bablok, regresión lineal y análisis de diagramas de diferencia en % 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 RIA de DiaSorin son sustancialmente equivalentes (pendiente de 0,89, ordenada en el origen de 6,6 pg/ml, R² de 0,96 y diferencia media en % del -2,8%), lo que indica, por tanto, que el ensayo de la invención puede capturar y detectar con precisión la cantidad de 1,25(OH)₂D circulante total en suero humano independientemente de las concentraciones séricas de DBP.

Finalmente, para demostrar la recuperación específica de 1,25(OH)₂D en suero humano, se determinó la concentración (ng/ml) de 25(OH)D total en cada muestra de panel (N = 17) usando el ensayo LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL autorizado por la FDA de 510 (k) (parte n.º 310600, DiaSorin Inc., Stillwater, MN, EE.UU.). Dado que no hubo correlación entre las dosis de 1,25(OH)₂D de RIA de DiaSorin autorizado de 51(k) y las dosis de 25(OH)D del ensayo LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL autorizado de 510(k) (figura 6), se concluyó que el ensayo de 1,25(OH)₂D de la invención recupera de manera específica y cuantitativa la cantidad de 1,25(OH)₂D total en suero humano independientemente de las concentraciones totales de 25(OH)D en suero. Estos resultados se ilustran en la figura 6, que muestra que no hubo correlación significativa (p = 0,4546) entre dosis de 1,25(OH)₂D y 25(OH)D.

Tabla 2

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

N.º	ID de muestra	Sexo	Tipo	1,25(OH) ₂ D de LIAISON	
				URL	Dosis (pg/ml)
1	M10284	Hombre	Aparentemente saludable	246,408	81,9
2	M10279	Hombre	Aparentemente saludable	231,717	73,7
3	M10302	Hombre	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 saludable	137,640	23,8
9	8316745	Mujer	Embarazada	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

Lista de secuencias

- <110> DiaSorin S.p.A.
- <120> Método y kit para detectar 1,25-dihidroxitamina D y anticuerpos relacionados
- <130> PC1286EC
- <160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 1
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly Met Gln
 10 1 5 10

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 2
 Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr
 1 5 10

20 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 3
 Ser Gly Leu Ile Asp Gly Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> *Mus musculus*

<400> 4
 His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asn Ile Gly
 35 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 5
 His Gly Thr Asn Leu Glu Asp
 1 5

45 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 6
 Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Phe Thr
 50 1 5

<210> 7
 <211> 110
 <212> PRT
 55 <213> *Mus musculus*

<400> 7

ES 2 780 823 T3

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

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

<210> 8

<211> 330

5 <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

10 ggccaagggg ccacgggtcac cgtctcctca 330

<210> 9

<211> 95

<212> PRT

15 <213> *Mus musculus*

<400> 9

ES 2 780 823 T3

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
 5 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 10
 cagtctccat cctccatgtc tgtatctctg ggagacacag tcagcatcac ttgccatgca 60
 agtcagggca ttagcagtaa tatagggtgg ttgcagcaga aaccaggaa atcatttaag 120
 ggcctgatct atcatggaac caacttgaa gatggagttc catcaaggtt cagtggcagt 180
 ggatctggag cagattattc tctcaccatc agcagcctgg aatctgaaga ttttcagac 240
 tattactgtg tacagtatgc tcagtttcca ttcacgttcg gctcggg 287

10

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal que se une al dominio de unión a ligando del complejo receptor de vitamina D (VDR-LBV)/1,25-dihidroxitamina D, en el que las secuencias de aminoácidos de las CDR del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal son SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y las secuencias de aminoácidos de las CDR del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal son SEQ ID NO: 4, 5 y 6.
2. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 o está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 8.
3. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 o está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 10.
4. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es una inmunoglobulina completa o un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en F(ab), F(ab')₂, F(v), F(d), anticuerpos de cadena sencilla (scFv).
5. Método para detectar 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)₂D) en una muestra de líquido biológico, comprendiendo el método las etapas de:
 - (i) ajustar el pH de la muestra de líquido biológico a un valor comprendido entre 6 y 9, y simultánea o posteriormente añadir a la muestra de líquido biológico una proteína receptora que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de vitamina D (VDR-LBD), obteniéndose de ese modo la unión de 1,25-dihidroxitamina D al VDR-LBD de la proteína receptora;
 - (ii) capturar la proteína receptora que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de vitamina D (VDR-LBD) unido a 1,25-dihidroxitamina D por medio de un anticuerpo monoclonal que se une al dominio de unión a ligando del complejo receptor de vitamina D (VDR-LBV)/1,25-dihidroxitamina D, en el que las secuencias de aminoácidos de las CDR del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal son SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y las secuencias de aminoácidos de las CDR del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal son SEQ ID NO: 4, 5 y 6; y
 - (iii) detectar la proteína receptora capturada que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de vitamina D (VDR-LBD) unido a 1,25-dihidroxitamina D.
6. Método según la reivindicación 5, en el que la proteína receptora es la proteína receptora de vitamina D completa o el dominio de unión a ligando (LBD) de la misma en forma aislada o modificada por ingeniería genética.
7. Método según la reivindicación 5 ó 6, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el resto de captura se inmoviliza sobre un soporte sólido.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el líquido biológico es sangre completa, plasma, suero u orina.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que en la etapa (i) el pH de la muestra de líquido biológico se ajusta a un valor comprendido entre 7 y 8,6.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, que es un inmunoensayo tipo sándwich.
12. Método según la reivindicación 11, en el que la etapa (iii) de detectar la proteína receptora capturada que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de vitamina D (VDR-LBD) unido a 1,25-dihidroxitamina D se lleva a cabo por medio de un anticuerpo detector anti-VDR-LBD marcado.
13. Kit para detectar 1,25-dihidroxitamina D en una muestra de líquido biológico, comprendiendo el kit:
 - una proteína receptora que comprende el dominio de unión a ligando del receptor de vitamina D (VDR-LBD);
 - un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1; y

- un tampón de unión que tiene un pH comprendido entre 6 y 9.

- 5
14. Kit según la reivindicación 13, en el que la proteína receptora es la proteína receptora de vitamina D completa o el dominio de unión a ligando de la misma en forma aislada o modificada por ingeniería genética.
15. Kit según la reivindicación 13 ó 14, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
- 10
16. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el tampón de unión tiene un pH comprendido entre 7 y 8,6.

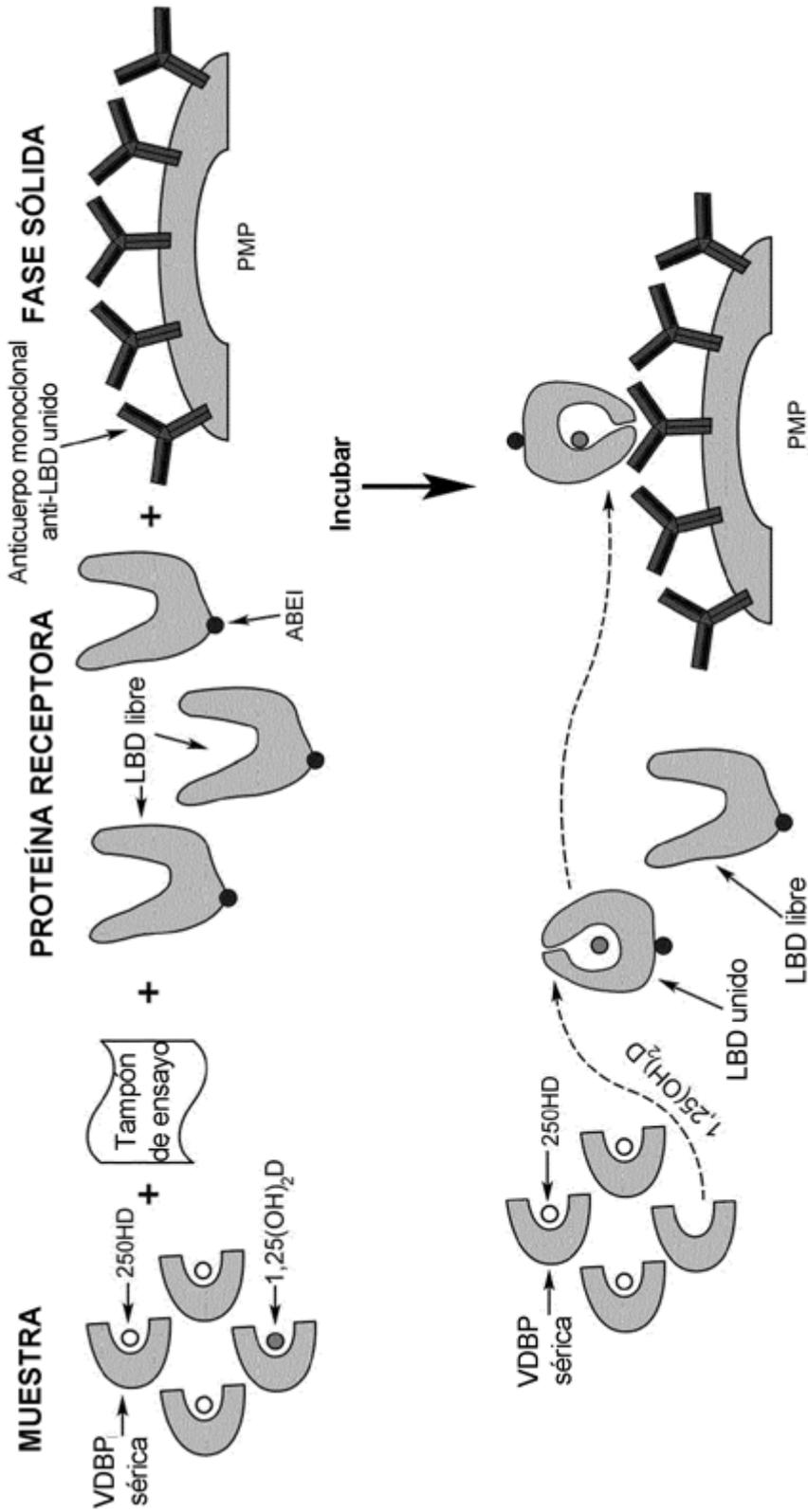
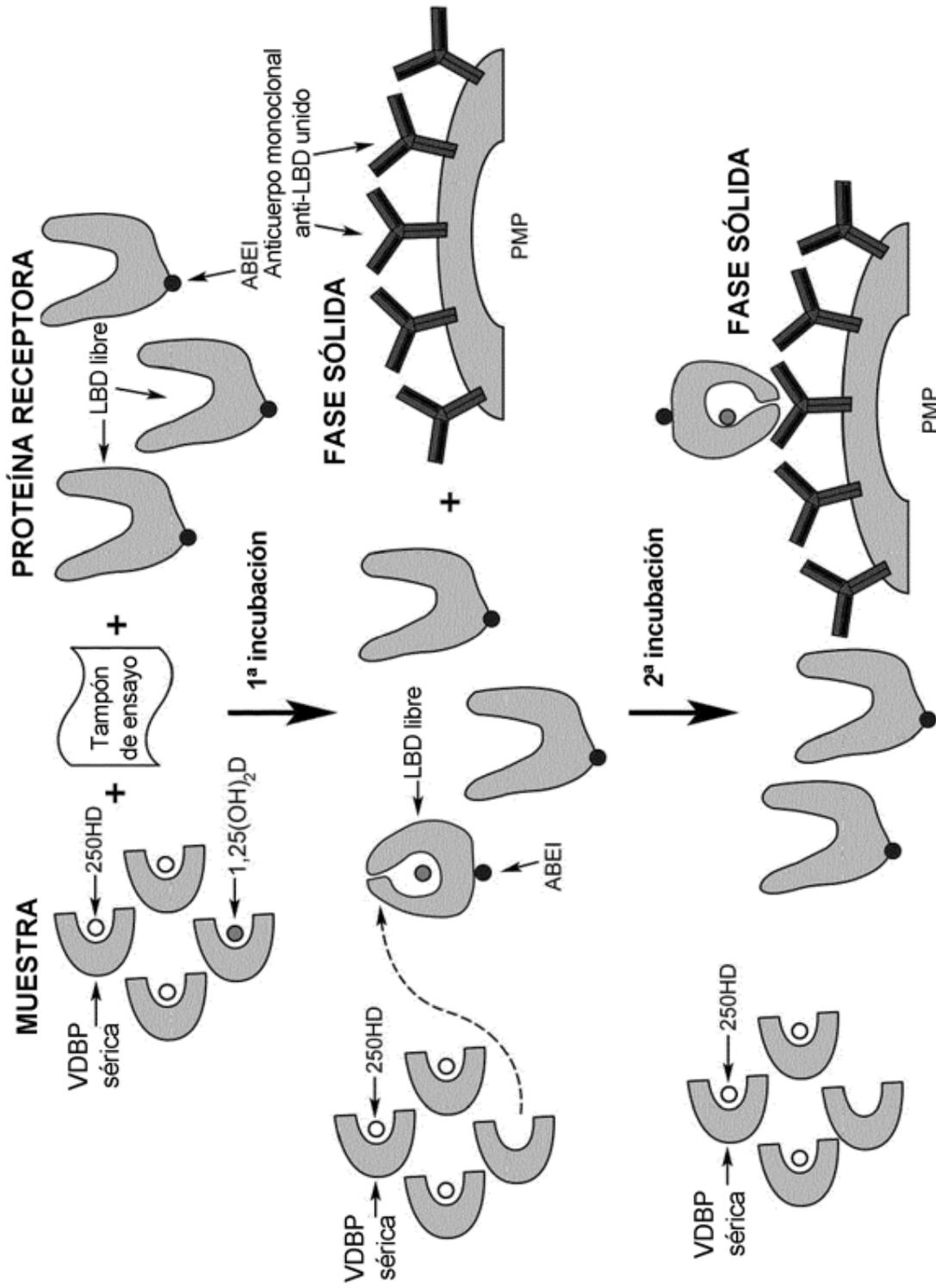


FIG. 1



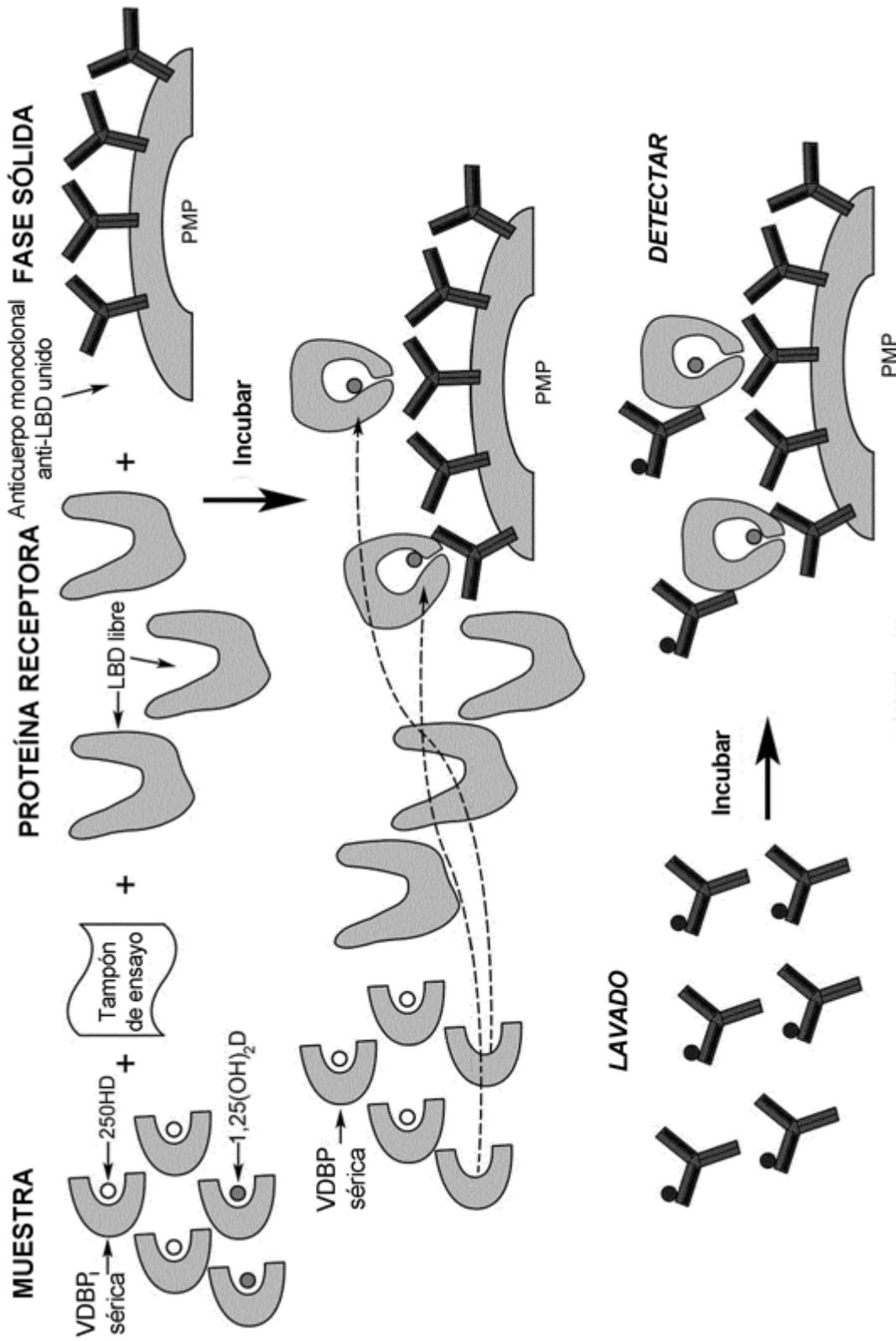


FIG. 3

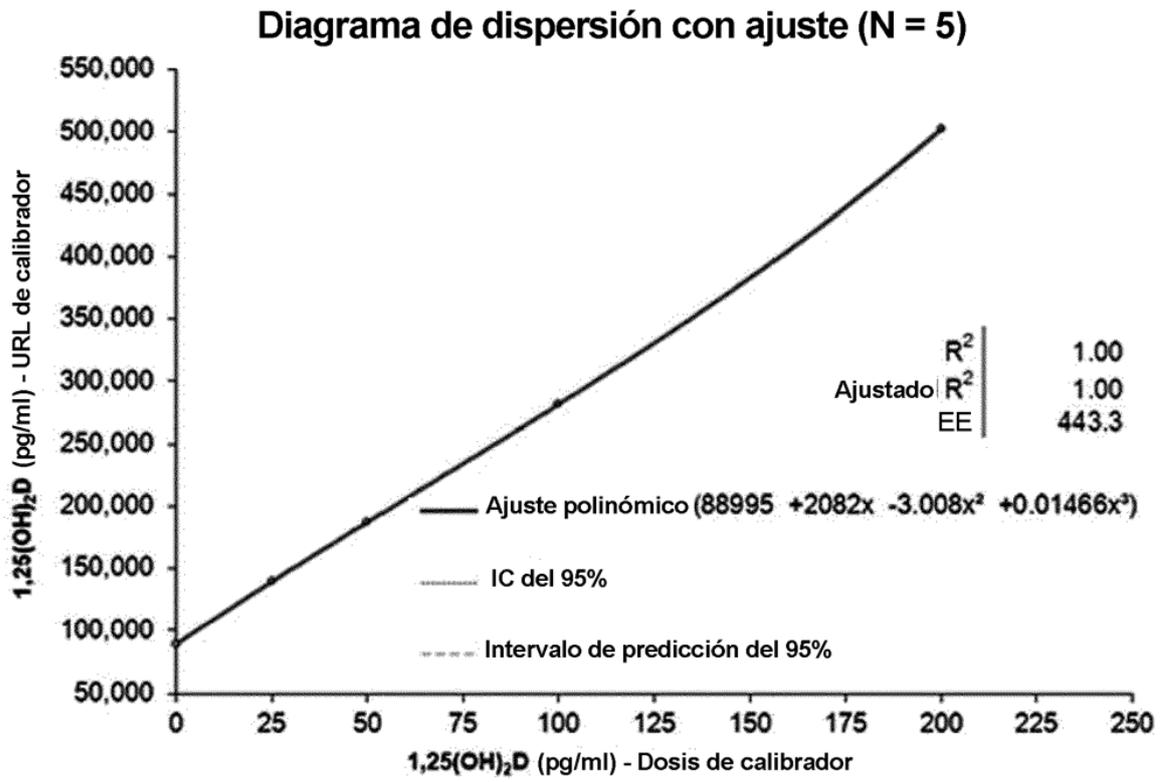


FIG. 4

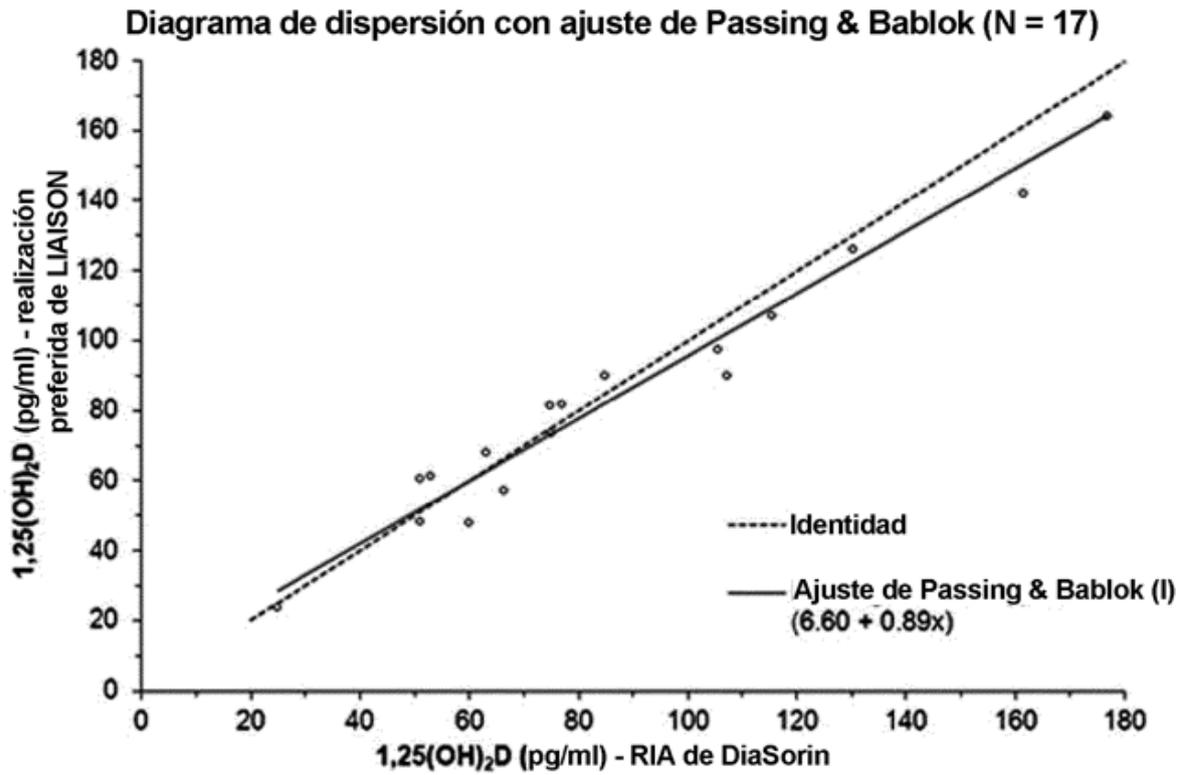


FIG. 5a

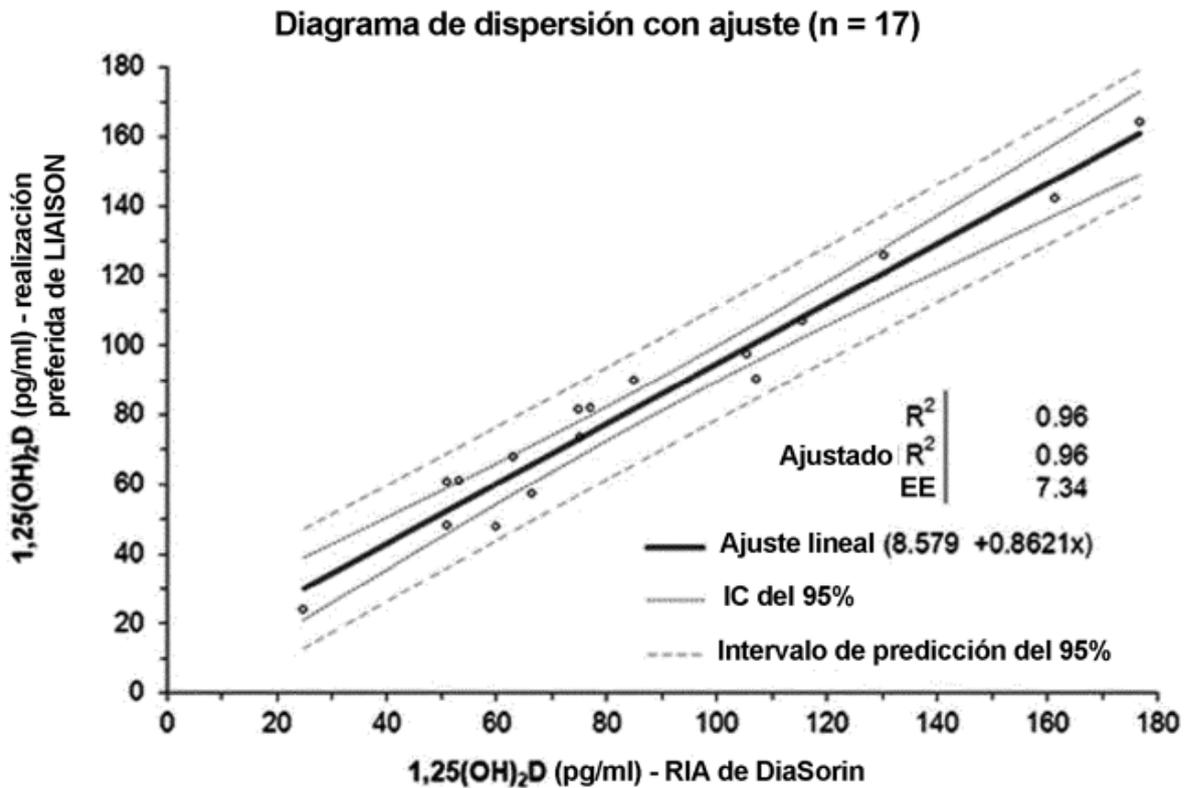


FIG. 5b

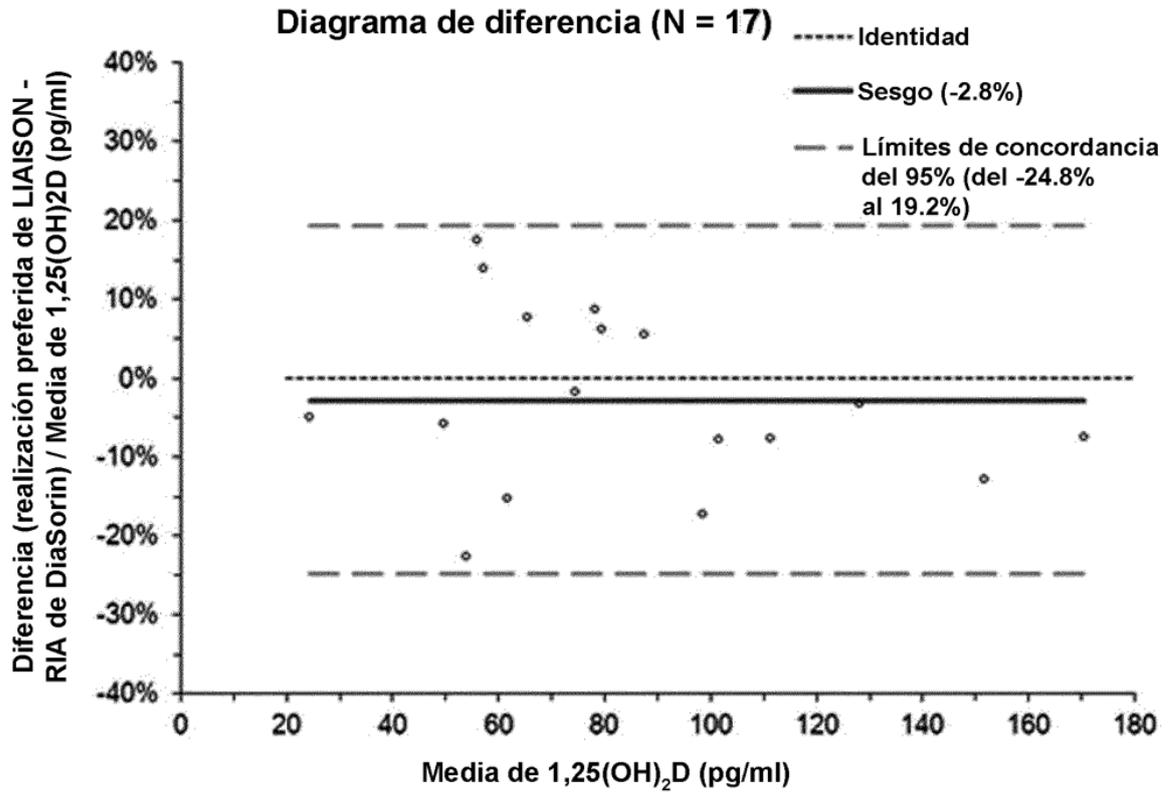


FIG. 5c

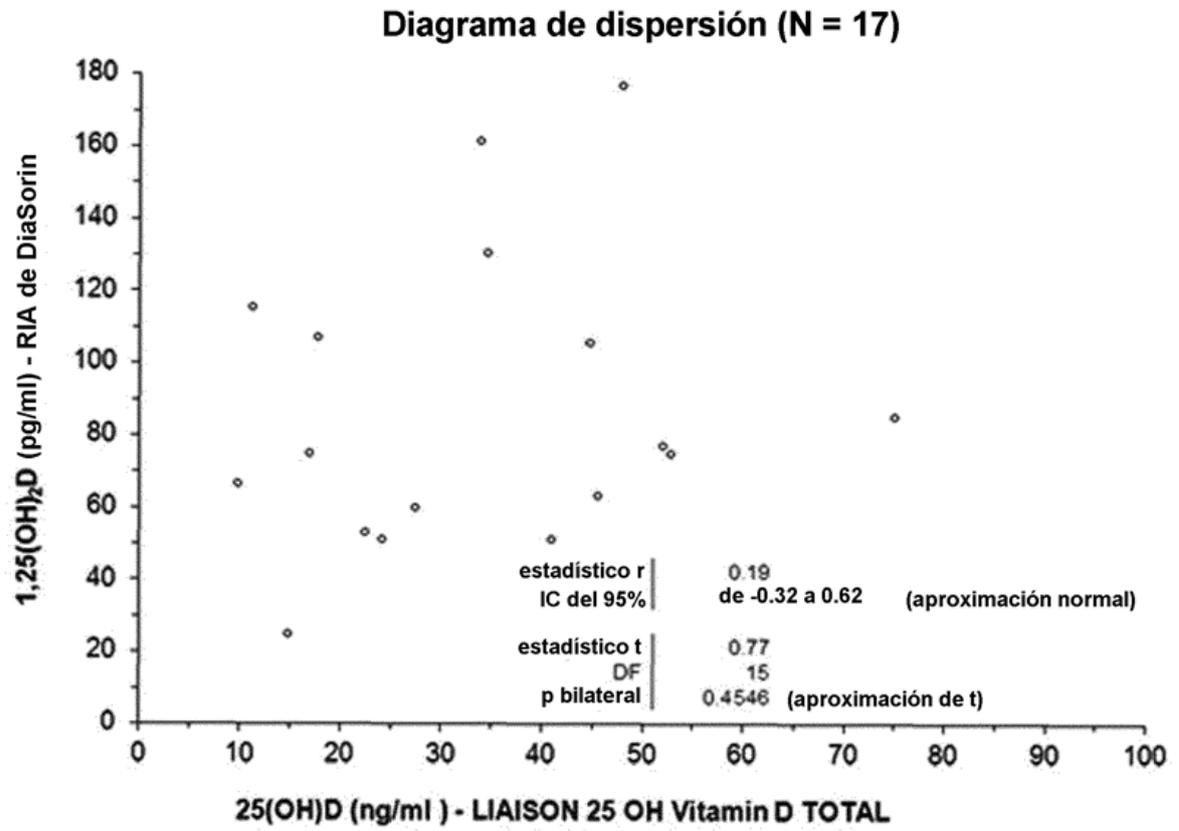


FIG. 6