

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 201 850**

21 Número de solicitud: 200003073

51 Int. Cl.7: **C07K 14/155**

**C07K 14/16**

**G01N 33/68**

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **21.12.2000**

71 Solicitante/s: **Universitat Autònoma de Barcelona  
08193 Bellaterra, Barcelona, ES**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2004**

72 Inventor/es: **Ferrer Miralles, Neus;  
Feliu i Gil, Jordi Xavier;  
Villaverde Corrales, Antonio Pedro;  
Rinas, Ursula;  
Miller, Annette y  
Cabrera Crespo, Joaquim**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.03.2004**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

54 Título: **Proteína recombinante para el diagnóstico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).**

57 Resumen:

Proteína recombinante para el diagnóstico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

La proteína recombinante comprende una proteína que presenta actividad b-galactosidasa en la que se ha insertado al menos una secuencia de aminoácidos que contiene al menos un epítipo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La presente invención se refiere a una proteína recombinante de fusión que tiene aplicación para el diagnóstico del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.

**ES 2 201 850 A1**

## DESCRIPCIÓN

Proteína recombinante para el diagnóstico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida).

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una proteína recombinante de fusión que tiene aplicación para el diagnóstico del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.

**Antecedentes de la invención**

La aparición de enfermedades infecciosas es uno de los temas de mayor preocupación en el ámbito de la sanidad humana. Por ejemplo, la amplia incidencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), constituye uno de los aspectos más importantes de los programas de investigación y de atención sanitaria especial. Las investigaciones sobre el VIH y la infección causada por este virus son objeto de grandes esfuerzos económicos y humanos, que son financiados tanto por fondos públicos como por compañías farmacéuticas privadas. El diseño de compuestos antivirales, el desarrollo de vacunas y nuevas herramientas para el diagnóstico son los principales objetivos que persiguen las investigaciones actuales.

Para poder aplicar medidas preventivas eficientes en la reducción de la dispersión del SIDA, sería deseable disponer de métodos analíticos rápidos, fiables y económicos para identificar los individuos infectados en los estadios iniciales de la infección. Los métodos analíticos heterogéneos actuales son largos, difíciles de automatizar y son propensos a interferencias debidas a los componentes del suero, lo que incrementa el coste del diagnóstico.

En los últimos años se han diseñado proteínas de fusión, construidas utilizando la tecnología del ADN recombinante, con el fin de estudiar la topología de proteínas de membrana, la expresión de librerías de proteínas y la construcción de biosensores proteicos (Doi, N. and Yanagawa, H. (1999) *Insertional gene fusion technology*. *FEBS Lett.* **457**, 1-4).

El enzima  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23), codificado por el gen *lacZ* de *Escherichia coli*, hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa (Jacob, F. and Monod, J. (1961) *Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins*. *J. Mol. Biol.* **3**, 318-356), que a su vez son metabolizadas por la bacteria como fuente de carbono. Asimismo, este enzima es capaz de hidrolizar otros sustratos que pueden dar lugar a compuestos coloreados que han sido utilizados para el estudio de un amplio rango de procesos metabólicos.

Se ha obtenido la estructura en 3 dimensiones (3D) de la  $\beta$ -galactosidasa, lo que ha permitido analizar la posibilidad de insertar péptidos heterólogos en los bucles expuestos al solvente. En este sentido, se han construido algunas  $\beta$ -galactosidasas recombinantes que contienen epítopos virales y que tienen la característica de traducir la interacción antígeno-anticuerpo en un cambio en la actividad enzimática fácilmente medible (Benito, A., Feliu, J.X., and Villaverde, A. (1996)  $\beta$ -Galactosidase enzymatic activity as a molecular probe to detect specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **271**, 21251-21256; Feliu J.X., Ramírez, E., and Villaverde, A. 1998. *Distinct mechanisms of antibody-mediated enzymatic reactivation in  $\beta$ -Galactosidase molecular sensors*. *FEBS Letters* **438**: 267-271. Feliu J.X., Ramírez, E., and Villaverde, A. 2000. *Distinct mechanisms of antibody-mediated enzymatic reactivation in  $\beta$ -Galactosidase molecular sensors (corrigendum)*. *FEBS Letters* **473**: 123). Así pues, estas proteínas quiméricas pueden ser una herramienta muy útil como biosensores para detectar específicamente determinados anticuerpos en muestras biológicas complejas como, por ejemplo, en sangre.

La presente invención se refiere a una proteína re-

combinante formada por una proteína con actividad  $\beta$ -galactosidasa en la que se ha insertado un epítipo del VIH. Dicha inserción conlleva una disminución en la actividad del enzima. Sin embargo, dicha actividad se recupera tras la unión de la proteína recombinante con anticuerpos anti-VIH, lo que permite la determinación de anticuerpos anti-VIH mediante una simple detección colorimétrica de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

**Descripción de la invención**

La presente invención se refiere a una proteína recombinante caracterizada porque comprende una proteína que presenta actividad  $\beta$ -galactosidasa en la que se ha insertado al menos una secuencia de aminoácidos que contiene al menos un epítipo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

En la presente invención por "proteína con actividad  $\beta$ -galactosidasa" se entiende una proteína que puede contener la secuencia completa o una secuencia parcial del enzima  $\beta$ -galactosidasa, o mutantes de la misma, de tal forma que dicha proteína tiene la capacidad de hidrolizar un sustrato de la misma manera como lo haría la proteína  $\beta$ -galactosidasa nativa.

En particular, una proteína que presenta actividad  $\beta$ -galactosidasa es el enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.

La presente invención se refiere también a una proteína recombinante en la que la secuencia de aminoácidos que contiene el epítipo del VIH se ha insertado en una posición que permite la actividad del enzima  $\beta$ -galactosidasa después de la unión de anticuerpos anti-VIH. En una realización preferida de la invención, la secuencia de aminoácidos que contiene el epítipo del VIH se ha insertado en una posición comprendida entre los aminoácidos 265 y 295, preferentemente entre 272 y 287. En otra realización preferida de la invención, la secuencia de aminoácidos que contiene el epítipo del VIH se ha insertado en una posición comprendida entre los aminoácidos 487 y 525, preferentemente entre 500 y 520, mientras que en otra realización preferida de la invención, la secuencia de aminoácidos que contiene el epítipo del VIH se ha insertado en una posición comprendida entre los aminoácidos 785 y 815, preferentemente entre 794 y 805.

Por otra parte, la presente invención se refiere a una proteína recombinante en la que la secuencia de aminoácidos insertada contiene un epítipo del VIH-1. Más concretamente, el epítipo contenido en la secuencia de aminoácidos insertada contiene al menos el epítipo P1 del VIH-1. Asimismo, la presente invención se refiere a una proteína recombinante en la que la secuencia de aminoácidos insertada contiene un epítipo del VIH-2.

En la presente invención se ha obtenido una proteína recombinante de fusión mediante la inserción, entre las posiciones 279 y 280 ó 795 y 796 de la proteína  $\beta$ -galactosidasa de *E. Coli* codificada en el gen *lacZ*, de un epítipo (P1) de la glicoproteína gp41 del VIH, lo que permitió generar un conjunto de proteínas que tenían péptidos víricos de diferentes tamaños que contenían el epítipo. Las posiciones entre los aminoácidos 279 y 280 y entre 795 y 796 corresponden a bucles expuestos al solvente de la  $\beta$ -galactosidasa y son adecuados como aceptores de fragmentos proteicos que contienen epítopos virales. El bucle que comprende los aminoácidos 272-287 de la  $\beta$ -galactosidasa está involucrado en la formación de la interfase activadora del tetrámero. El bucle que comprende los aminoácidos 794-805 forma parte directamente del centro activo del enzima.

En la presente invención, se han insertado en los bucles descritos segmentos que incluían epítopos B del precursor de la proteína de la envuelta del virus VIH, con tamaños

comprendidos entre 15 y 45 aminoácidos (Fig. 1).

Los resultados obtenidos indican que ambas posiciones en las  $\beta$ -galactosidasas recombinantes son adecuadas para la modulación enzimática tras la unión con un anticuerpo monoclonal anti-VIH (Fig. 2). Sin embargo, cabe destacar que no todas las proteínas que se obtuvieron y que contenían epítomos en posiciones potencialmente modulables presentaban reacción de unión al anticuerpo (Fig. 2). Además, las enzimas modulables pueden ser reactivados por incubación con sueros de pacientes infectados con el VIH (Fig. 2). Otra característica ventajosa de la presente invención es que las proteínas recombinantes obtenidas permiten discriminar entre muestras seroreactivas de VIH-1 y VIH-2 (Fig. 2), puesto que las secuencias aminoacídicas de sus respectivas proteínas de cápside presentan diferencias significativas.

La presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico que utiliza la proteína recombinante de la invención para la determinación del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Asimismo, la presente invención se refiere también a la utilización de la proteína recombinante descrita anteriormente en la determinación de anticuerpos anti-VIH en muestras diversas.

#### Descripción de las figuras

En la figura 1A se describe la secuencia en aminoácidos de los diferentes sitios de inserción utilizados para la construcción de proteínas  $\beta$ -galactosidasa recombinantes con un péptido vírico de VIH insertado. La numeración de los residuos en las proteínas LACZ y JX795 es según se describe en Kalnins, A., Otto, K., Ruther, U., and Muller-Hill, B. (1983) *Sequence of the lacZ gene of Escherichia coli*. *EMBO J.* 2, 593-597.

La figura 1B describe la secuencia de los diferentes péptidos víricos insertados por fusión de DNA en los plásmidos parentales pJLACZ y pJX795. La numeración de los residuos es según se ha descrito en (Sanchez-Pescador, R., Power, M.D., Barr, P.J., Steimer, K.S., Stempien, M.M., Brown-Shimer, S.L., Gee, W.W., Renard, A., Randolph, A., and Levy, J.A. (1985) *Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2)*. *Science* 227, 484-492; Rainer, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.L.J., Starcich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway Jr, S.R., Pearson, M.L., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Gharyeb, J., Chang, N.T., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F. (1985) *Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III*. *Nature* 313, 277-284). Los aminoácidos en negrita corresponden al epítipo P1.

En la figura 2 se muestra la reactivación de diferentes proteínas  $\beta$ -galactosidasas recombinantes que contienen epítomos del VIH insertados, después de la incubación con anticuerpos monoclonales contra el epítipo P1 de VIH-1 (barras negras), y con sueros humanos de pacientes infectados con el virus VIH-1 (barras grises) o con el virus VIH-2 (barras ralladas).

#### Ejemplos

A continuación, se describe un ejemplo ilustrativo no limitante de la invención.

#### Ejemplo 1

*Obtención de una proteína recombinante  $\beta$ -galactosidasa-epítipo P1 del VIH-1.*

*Cepas bacterianas, plásmidos y estrategias de clonación.*

Se utilizó, para la producción de proteína de la mayoría de constructos, la cepa bacteriana *E. Coli* MC1061, una cepa derivada de la K12 (F,  $\lambda$ ),  $\Delta$  (*araA-leu*)7697,  $\Delta$  (*cod-lac1*)3, *ara D139*, *galE15*, *galK16*, *hsdR2*, *mcrA*, *mcrB*, *relA1*, *rpsL150*(*strR*), *spoT1*. Los plásmidos pJLACZ y su de-

rivado pJX795 codifican  $\beta$ -galactosidasas a partir de su octavo residuo y su expresión se encuentra bajo el control de los promotores  $p_L$  y  $p_R$  del bacteriófago lambda y su represor CI857.

La construcción de las  $\beta$ -galactosidasas que mostraban los epítomos contenidos en los aminoácidos 589-618 del precursor gp160 del VIH-1 fue realizado utilizando fragmentos sintéticos de DNA que codifican las secuencias aminoacídicas deseadas (Fig. 1). Los clones resultantes fueron caracterizadas mediante PCR, análisis de restricción y confirmados por secuenciación de DNA utilizando un secuenciador de DNA ABI 373A y un kit de secuenciación ABI PRISM (PE Applied Biosystems). Para la clonación entre las posiciones 279 y 280 y entre 795 y 796 de LACZ, se añadieron las dianas de restricción *Clal* y *BamHI* respectivamente a ambos extremos de los oligonucleótidos sintéticos.

#### Producción y purificación de proteínas

Los cultivos celulares fueron incubados a 28°C en medio Luria-Bertani (LB), que contenía 50  $\mu$ g/ml de ampicilina y 30  $\mu$ g/ml de estreptomocina, hasta que alcanzaron una  $DO_{550}$  de 0,4, siendo entonces transferidos a un baño de agua a 42°C durante tres horas, para inducir así la expresión de las proteínas recombinantes. Los sedimentos celulares fueron resuspendidos en 10 ml de Tris-HCl 50 mM,  $MgCl_2$  10 mM, NaCl 100 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, pH 7,2, con los inhibidores de proteasas benzamidina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo a 25  $\mu$ M y 1 mM, respectivamente. Las células intactas fueron lisadas mediante ultrasonificación y el sobrenadante clarificado fue cargado en una columna de cromatografía de afinidad. La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente a 280 nm utilizando el coeficiente de absorción molar de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. Coli* ( $\epsilon = 1,5 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^5 M^{-1}cm^{-1}$ ).

#### Ensayos enzimáticos y determinación de la $k_{cat}$

La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó según los métodos descritos anteriormente (Feliu, J.X., Cubarsí, R. and Villaverde, A. (1998) *Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of E. coli cells*. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 536-540). La concentración de las proteínas modificadas se calculó mediante un ensayo de Western blot, utilizando como patrón cantidades conocidas de  $\beta$ -galactosidasa pura (Roche Diagnostics). La concentración de enzima activo se obtuvo por comparación de la actividad específica de un extracto de proteína con la actividad específica de las proteínas mutantes purificadas. Para determinar la  $k_{cat}$ , se incubaron en placas de ELISA cantidades conocidas de proteínas recombinantes con diferentes concentraciones de sustrato (orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, ONPG). La absorbancia a 414 nm se obtuvo utilizando un lector Labsystems iEMS Reader MF. Los valores de  $\Delta A/min$  fueron convertidos a constantes de velocidad y se determinaron los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ . La constante de velocidad de primer orden  $k_{cat}$  para cada proteína mutante se expresó como  $V_{max}/concentración$  de enzima activo ( $s^{-1}$ ).

#### Ensayo de modulación

El ensayo de modulación se realizó en placas de ELISA. Para ello, se incubaron 2 pmol en 80  $\mu$ l de proteína purificada en tampón Z (60 mM  $Na_2HPO_4$ , 40 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM KCl y 1 mM  $MgSO_4$ , pH 7) con BSA al 1%, con o sin anticuerpos monoclonales anti-P1 a una concentración final de 25 ng/ $\mu$ l, o bien incubados con o sin sueros de pacientes infectados con VIH (factor de dilución 1:40), a 28°C durante 1 hora. Se añadieron a continuación 40  $\mu$ l de ONPG a una concentración de 2 mg/ml. Cuando aparecía el color amarillo o rojo la reacción se detuvo mediante la adición de 50

$\mu$ l de 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . La absorbancia se midió a 414 nm en un lector Labsystems iEMS Reader MF. Los valores se han expresado como la actividad relativa entre la proteína mutante

en contacto con el anticuerpo en relación a la actividad de la misma proteína sin anticuerpo.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Proteína recombinante **caracterizada** porque comprende una proteína que presenta actividad  $\beta$ -galactosidasa en la que se ha insertado al menos una secuencia de aminoácidos que contiene al menos un epítipo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

2. Proteína según la reivindicación 1 en la que la proteína que presenta actividad  $\beta$ -galactosidasa es el enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*.

3. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en la que la secuencia de aminoácidos que contiene el epítipo del VIH se ha insertado en una posición que permite la actividad del enzima  $\beta$ -galactosidasa después de la unión de anticuerpos anti-VIH.

4. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que la secuencia de aminoácidos que contiene el epítipo del VIH se ha insertado en una posición comprendida entre los aminoácidos 265 y 295, preferentemente entre 272 y 287.

5. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que la secuencia de aminoácidos que contiene el epítipo del VIH se ha insertado en una posición comprendida

entre los aminoácidos 487 y 525, preferentemente entre 500 y 520.

6. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que la secuencia de aminoácidos que contiene el epítipo del VIH se ha insertado en una posición comprendida entre los aminoácidos 785 y 815, preferentemente entre 794 y 805.

7. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la secuencia de aminoácidos insertada contiene un epítipo del VIH-1.

8. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la secuencia de aminoácidos insertada contiene un epítipo del VIH-2.

9. Proteína según la reivindicación 7, en la que el epítipo contenido en la secuencia de aminoácidos insertada contiene al menos el epítipo P1 del VIH-1.

10. Kit de diagnóstico que utiliza la proteína recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la determinación del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

11. Proteína recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para utilizar en la determinación de anticuerpos anti-VIH.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

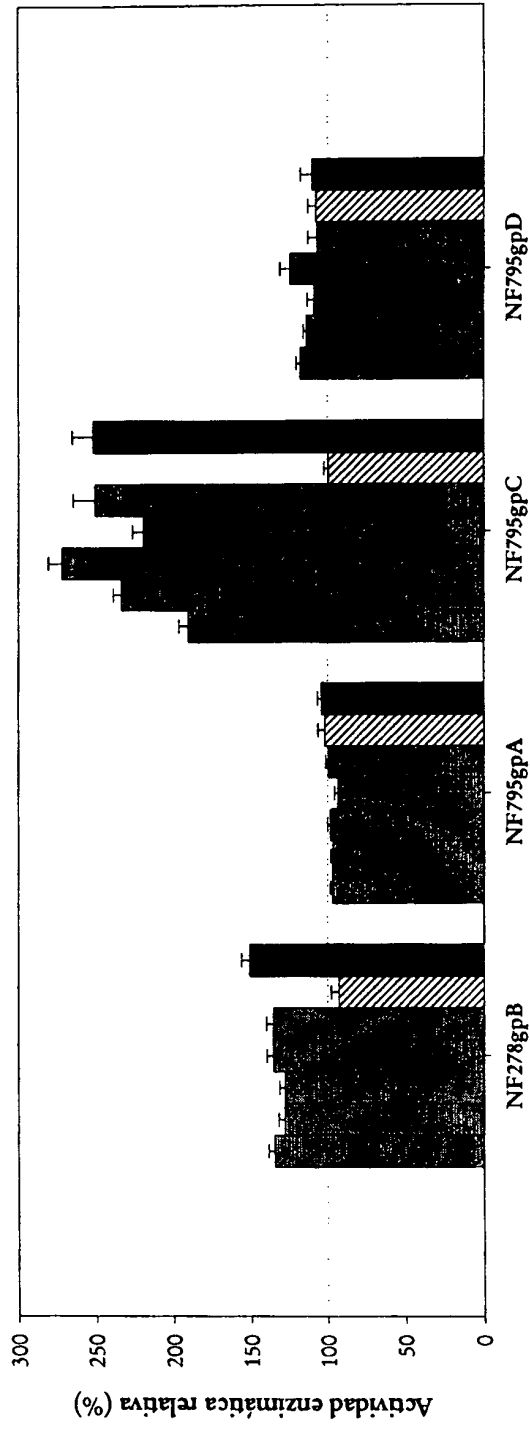
Figura 1

A	
Plásmido parental	Lugar de la inserción
PJLACZ	<sup>261</sup> LWQGETQVASGTAPFGGEII ▼ DERGGYADRVTLRNLNVENPK <sup>299</sup>
PJX795	<sup>776</sup> LLTPLRDQFTRAPLDNDIGV ▼ REATRDPNAWVERWKAAGH <sup>815</sup>

B			
Nombre fragmento	Péptido insertado	Amino-ácidos insertados	Proteínas
gpA	<sup>589</sup> AVERYLKDQQLLGIW <sup>603</sup>	15	NF795gpA
gpB	<sup>584</sup> QARILAVERYLKDQQLLGIWGCCSGK <sup>608</sup>	25	NF278gpB
gpC	<sup>579</sup> GIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCCSGKLICTT <sup>613</sup>	35	NF795gpC
gpD	<sup>574</sup> QLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGCCSGKLICTT AVPWN <sup>618</sup>	45	NF795gpD

Figura 2





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 201 850

② Nº de solicitud: 200003073

③ Fecha de presentación de la solicitud: 21.12.2000

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C07K 14/155, 14/16, G01N 33/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BENITO, A. et al. "Beta-galactosidase enzymatic activity as a molecular probe to detect specific antibodies". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 30 de agosto de 1996, Vol. 271, nº 35, páginas 21251-21256, todo el documento.	1-11
A	WO 9104038 A (THE UNITED STATES OF AMERICA) 04.04.1991, todo el documento.	1-11

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

16.01.2004

**Examinador**

M. Novoa Sanjurjo

**Página**

1/1