

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 340 753**

21 Número de solicitud: 200802551

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/34** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **04.09.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**08.06.2010**

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 50 %)  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**  
**Universidad Autónoma de Barcelona** (Titular al 50 %)

72 Inventor/es: **Laczka, Olivier;**  
**Campo, Francisco Javier del;**  
**Muñoz Pascual, Francisco Xavier;**  
**Villaverde Corrales, Antonio;**  
**Ferrer Miralles, Neus y**  
**Ferraz Colomina, Rosa María**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Biosensor para la detección de anticuerpos anti-VIH.**

57 Resumen:

Biosensor para la detección de anticuerpos anti-VIH.  
En la presente invención se provee un biosensor capaz de detectar anticuerpos anti-VIH en una muestra biológica, basado en la utilización combinada de una enzima alostérica, modificada genéticamente, y una matriz con redes de microelectrodos.

ES 2 340 753 A1

## DESCRIPCIÓN

Biosensor para la detección de anticuerpos anti-VIH.

5 En la presente invención se provee un biosensor capaz de detectar anticuerpos anti-VIH en una muestra biológica, basado en la utilización combinada de una enzima alostérica, modificada genéticamente, y una matriz con redes de microelectrodos. Una de las ventajas de este biosensor es su alta sensibilidad, su sencillez en la detección y su portabilidad.

10 **Estado de la técnica anterior**

El diagnóstico puntual de enfermedades infecciosas es un elemento clave en el campo de la medicina clínica y veterinaria. En la actualidad se dedican grandes esfuerzos a la mejora de ensayos ya existentes, lo que permite la  
15 descubrimiento de estrategias nuevas para asegurar una detección de infecciones con mejor sensibilidad, seguridad y eficacia (Iqbal *et al.*, 2000. *Biosens. Bioelectron.*, 15: 549-578; Domínguez E.A., 1993. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 2286-2290; Lennette E. H. and Smith, 1999. *Laboratory diagnosis of viral infections, Informa Health Care*). En los 20 últimos años, el virus de la inmunodeficiencia Humana (VIH) ha sido uno de los virus más estudiados, y la diana principal en la concepción de nuevos procesos analíticos (McDougal, 2001. *AIDS Rev.*, 3: 183-193), directos o indirectos según se utilice como diana el virus o los anticuerpos dirigidos contra él. En el primer caso, los componentes virales (por  
20 ejemplo ácidos nucleicos o proteínas) se pueden detectar mediante ELISA-antigénico (Schüpbach *et al.*, 2000. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 16: 441-445), o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Marie Louie, 2000. *CMAJ*, 163: 301-309; Elnifro *et al.*, 2000. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13: 559-570; Ballagi-Pordany, 1993. *Vet. Res. Commun.*, 17: 55-72; Niesters, 2004. *Clinical Microbiology Infect.*, 10: 5-11; Hjelle and Busch, 1989. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 113: 975-980). Los métodos indirectos demuestran la presencia de anticuerpos anti-virales, siendo los más comunes del tipo anticuerpo-Elisa, Western blot (Steckelberg and Cockerill, 1998. *Mayo Clin. Proc.*, 63: 373-380) u otros inmunoensayos (Branson, 2007. *Clin. Infect. Dis.*, 45: S221-S225).

La posibilidad de disponer de plataformas portátiles que permitan una detección rápida es particularmente necesaria en zonas geográficas carentes de instalaciones médicas adecuadas. En este contexto, los biosensores parecen  
30 ser una alternativa prometedora a los métodos convencionales de análisis (Amano and Cheng, 2005. *Anal. Bioanal. Chem.*, 381: 156-164; Bobby Pejic *et al.*, 2006. *Analyst*, 131: 1079-1090). Las enzimas alostéricas pueden ser utilizadas como biocomponentes eficaces dado que su actividad se ve modulada por el reconocimiento específico de péptidos diana, fuera del sitio activo, por anticuerpos específicos contra dichos péptidos (Villaverde, 2003. *FEBS Lett.*, 554: 169-172). Los sensores alostéricos se pueden construir mediante ingeniería de inserción proteínica a partir de la  
35 selección apropiada de sitios permisivos en la enzima y de un péptido antígeno del patógeno. La reacción alostérica se puede seguir en ensayos enzimáticos y después de tiempos cortos de reacción en ensayos homogéneos sencillos. Esto ofrece posibilidades interesantes para el diagnóstico molecular rápido y ultra-rápido de enfermedades infecciosas.

40 Entre las diferentes enzimas adaptadas para ser utilizadas como sensores alostéricos (Villaverde, 2003. *FEBS Lett.*, 554: 169-172), la  $\beta$ -galactosidasa producida por *Escherichia coli* ( $\beta$ -D-galactoside hydrolase, E.C. 3.2.1.23) es muy conveniente. Esta proteína está codificada en el gen *lacZ* y se compone de cuatro sub-unidades de 116353 Da cada una, unidas entre sí mediante unión no-covalente (Jacobson *et al.*, 1994. *Nature*, 369: 761-766). Tiene la facultad de hidrolizar tanto la lactosa como algunos análogos sintéticos.

45 Recientemente se han descrito métodos que usan la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*, NF795gpC, inmovilizada en agarosa activada, para la detección de anticuerpos anti-VIH mediante la medición de la intensidad de color que aparece como consecuencia de la transformación del sustrato ONPG por acción de la enzima alostérica (Ferraza *et al.*, 2007. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(4): 492-497).

50 En la presente invención se usa para-aminofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido (PAPG), un sustrato que da lugar a la formación de p-aminofenol, un producto electro-activo, con la finalidad de desarrollar una nueva plataforma sensora basada en redes de microelectrodos. Una ventaja técnica importante de la presente invención respecto del método descrito por Ferraza *et al.* (2007) es que la combinación de las enzimas descritas y las redes de microelectrodos,  
55 dotan al nuevo biosensor de una mayor sensibilidad, con lo que se incrementa la eficacia en la detección de personas infectadas con el virus VIH.

En este sentido, en la presente invención, se presenta una solución al problema de la detección del virus VIH en personas infectadas que mejora el diagnóstico de esta enfermedad infecciosa en rapidez y especificidad al tiempo que  
60 provee un sistema de detección portátil y que no requiere detectores de alto coste ni personal especializado, como es el caso de los sistemas actuales citados anteriormente.

**Explicación de la invención**

65 En la presente invención se provee un sistema biosensor para la detección de anticuerpos anti-VIH en una muestra biológica, basado en la utilización combinada de una enzima alostérica ( $\beta$ -galactosidasa), modificada genéticamente y una matriz con redes de microelectrodos. Las enzimas alostéricas presentan una actividad específica diferente según su conformación estérica. Dicha conformación se modifica al unirse la enzima a un efector alostérico específico. Cuando

## ES 2 340 753 A1

los anticuerpos anti-VIH se unen a la enzima por medio de péptidos, que constituyen la modificación de la enzima alostérica original, la conformación 3D cambia positivamente afectando al rendimiento del sitio activo, estimulando la actividad enzimática. Un punto clave del biosensor que se presenta en esta invención, es la utilización de un sustrato de la enzima alostérica cuyo producto sea electroactivo, por ejemplo, una molécula que pueda ser oxidada sobre diversos materiales de los microelectrodos dentro de un rango de pH conveniente para la enzima alostérica. Otra de las ventajas de este biosensor es su alta sensibilidad, pudiéndose detectar concentraciones traza de producto.

La concentración de producto es una medida indirecta de la cantidad de anticuerpos anti-VIH, presentes en la muestra biológica, que se unen a los péptidos anclados en la enzima alostérica original ya que, como se ha comentado previamente, la unión de los anticuerpos anti-VIH (ejercen de efectores alostéricos), favorece la actividad enzimática.

Así pues, la presente invención combina dos grandes avances tecnológicos que permiten la detección de la infección por VIH en muestras de suero sanguíneo. Se ha utilizado una  $\beta$ -galactosidasa alostérica genéticamente modificada que responde a la presencia de anticuerpos anti-VIH. Además se han utilizado microtecnologías para fabricar redes de microelectrodos como transductor de la señal electroquímica, generada por el producto de la reacción enzimática, que es detectada por sistemas sencillos descritos más adelante.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la presente invención se describe un biosensor que comprende:

- a. una enzima alostérica modificada, al menos, por la adición de un péptido reconocido por anticuerpos anti-VIH,
- b. un transductor que comprende una matriz con redes de microelectrodos y
- c. un detector de la señal electroquímica.

El término “enzima alostérica” hace referencia a una enzima cuya actividad está regulada mediante uno o varios centros alostéricos. El centro alostérico es un sitio, distinto del centro activo de la enzima, al que se une un efector (llamado efector alostérico) de manera reversible y no covalente. La unión de este efector modifica la estructura tridimensional de la enzima y llega a afectar la configuración del sitio activo, por lo que, en el caso de esta invención, aumenta su actividad enzimática.

El péptido o péptidos adicionados a la enzima alostérica deben ser reconocidos por alguno de los anticuerpos anti-VIH generados por el organismo humano o animal como consecuencia de la infección de éstos por el virus VIH. La secuencia de los péptidos definidos se corresponde con la secuencia de la proteína reconocida por los anticuerpos generados por el sistema inmune, esta proteína se denomina antígeno y la secuencia reconocida por los anticuerpos se denomina epítipo. Estos epítipos se unen con su anticuerpo en una interacción altamente específica que permite a los anticuerpos identificar y unirse solamente a su antígeno único. Por tanto, los péptidos adicionados a la enzima alostérica corresponden a epítipos de proteínas del virus VIH, generalmente proteínas de cubierta tales como gp41 o gp120, sin excluir los epítipos de otros posibles antígenos.

Además, la modificación de la enzima alostérica que forma parte del biosensor de la presente invención, puede incluir adiciones de nucleótidos o aminoácidos (modificados o no) en las regiones N-terminal y/o C-terminal (como por ejemplo codones de terminación) así como cualquier eliminación o adición de nucleótidos o aminoácidos (modificados o no) en los sitios internos de su secuencia.

Un biosensor combina un componente de naturaleza biológica y otro físico-químico. En la presente invención, el biosensor se compone de tres partes: el sensor biológico, el transductor y el detector.

El transductor del biosensor de la presente invención es el componente que transforma la aparición de producto enzimático en una señal. El transductor es una matriz compuesta por redes de microelectrodos que convierte la reacción bioquímica en una señal eléctrica cuantificable.

Los microelectrodos son una potente y versátil herramienta en el estudio de los procesos electroquímicos. Las ventajas de los microelectrodos son diversas, como su pequeño tamaño, su uso en diferentes ambientes, su funcionamiento con volúmenes muy pequeños y su capacidad de detectar concentraciones traza de diversos elementos. Las redes de microelectrodos son uniones de microelectrodos conectados en paralelo, normalmente. Tienen las ventajas de los microelectrodos y además añaden otra muy importante como es la amplificación de la corriente eléctrica donde la corriente total es la suma de la corriente en cada uno de los microelectrodos individuales.

Las redes de microelectrodos pueden presentarse como una red ordenada de microelectrodos o una red aleatoria y en otras disposiciones como microbandas.

En el ejemplo 2 de la presente invención se hace referencia al sistema empleado en la fabricación de los microelectrodos, especificando la cantidad de microdiscos, su diámetro y su disposición ordenada en la matriz.

La cantidad de microelectrodos presentes en una red afecta a la magnitud global de la corriente observada. Así, aumentar el número de elementos de la red tiene como consecuencia un aumento de la corriente registrada, porque las

## ES 2 340 753 A1

corrientes recogidas por cada microelectrodo son aditivas. Esto permite emplear instrumentación menos sensible, con lo que se pueden abaratar los costes de diseño instrumental y de los componentes necesarios.

Sin embargo, más importante que el número de elementos que conforman la matriz (ya que podría decirse que cuantos más, mejor) resulta tratar de asegurar el comportamiento independiente de unos microelectrodos con respecto a otros, de manera que no se apantallen entre sí. Esto se consigue alejando los microdiscos más allá de una distancia mínima que viene marcada por parámetros como el tiempo experimental y el coeficiente de difusión de las especies involucradas. Se puede estimar la distancia que recorrerán las moléculas, de forma grosera, utilizando la siguiente expresión:

$d = \sqrt{D \times t}$ , donde  $d$  es la distancia recorrida (en m),  $D$  es el coeficiente de difusión de la molécula en cuestión (en  $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) y  $t$  el tiempo que dura el experimento (en s).

En la presente invención, por tratarse de tiempos demasiado largos, podría pensarse que las capas de difusión de los microelectrodos de la red están completamente solapadas, por lo que el dispositivo se comportaría prácticamente como un macroelectrodo cuya área fuese la de la superficie ocupada por la red de microelectrodos. Sin embargo, debido a que el mecanismo de formación del producto que detecta nuestra aplicación comienza con una concentración inicial de valor cero y la producción sucede de forma homogénea en todo el espacio de la disolución, la utilización de una red de microelectrodos conserva la ventaja de presentar una mayor sensibilidad frente a los macroelectrodos convencionales.

El principio de la detección electroquímica es la transferencia de carga eléctrica entre la sustancia analizada (producto de la reacción de la enzima alostérica y el sustrato) y un conductor eléctrico empleando un electrodo de trabajo. Esta transferencia de carga (que es la detectada), se debe a la oxidación o reducción del producto sobre el electrodo de trabajo cuando se aplica un potencial constante con respecto al electrodo de referencia. La reacción electroquímica envuelve una transferencia de carga igual y opuesta al electrodo auxiliar, la cual no se toma en consideración en el estudio del comportamiento del producto de la reacción enzimática.

En la presente invención, tal como se describe en los ejemplos, se han empleado los siguientes electrodos:

- Electrodo de trabajo: la red de microelectrodos.
- Electrodo de referencia: electrodo Ag/AgCl (3M KCl).
- Electrodo auxiliar: barra de carbón vítreo.

El empleo de los tipos de electrodos de referencia y auxiliar descritos en esta invención no limita el uso de otros electrodos que tengan como objetivo la detección de la señal electroquímica generada por el producto de la reacción como consecuencia de la actividad de la enzima alostérica modificada descrita en otros apartados.

Los detectores de la señal electroquímica pueden ser amperométricos o coulométricos. La diferencia entre amperometría y coulometría es que en la amperometría se mide la corriente producida por la oxidación o la reducción de analito, pudiendo ser esta parcial o total. La coulometría, por otro lado, mide la carga total, es decir, la integral de la corriente en el tiempo. Esto hace que la coulometría resulte más sensible, ya que la carga siempre aumenta de forma lineal con el tiempo, en tanto que la corriente puede aumentar o disminuir a cada instante. También pueden ser usados otros tipos de detectores como por ejemplo, detector potenciométrico, conductimétrico o capacitométrico.

En una realización preferida, la enzima alostérica comprendida en el biosensor de la invención es la  $\beta$ -galactosidasa.

Esta enzima se refiere a cualquier  $\beta$ -galactosidasa natural o artificial que presente las características de la enzima alostérica de esta invención. La  $\beta$ -galactosidasa es una enzima con actividad hidrolasa que cataliza la hidrólisis de  $\beta$ -galactósidos a monosacáridos. Esta enzima está codificada por el gen *LacZ* y comprende cuatro subunidades unidas entre sí mediante enlaces no covalentes. La  $\beta$ -galactosidasa tiene la facultad de hidrolizar tanto la lactosa como algunos análogos sintéticos que son empleados principalmente para ensayos enzimáticos.

En otra realización preferida, el péptido adicionado a la enzima alostérica es un epítipo de la glicoproteína transmembrana gp41 del virus VIH.

La cubierta externa del VIH es una envuelta de lípidos que proceden de la membrana celular. Sobresalen de esta cubierta las glicoproteínas transmembrana virales gp41 y las glicoproteínas de cubierta gp120, que permiten la unión del VIH a las células diana por medio de una zona de reconocimiento. En esta zona reside la secuencia del epítipo donde se unen los anticuerpos generados por la respuesta inmune. El VIH infecta a las células que tengan en su superficie secuencias reconocidas por las glicoproteínas gp41 y gp120, de este modo el virus se une a la membrana celular.

En otra realización preferida, el biosensor está formado por una enzima alostérica modificada seleccionada de la lista que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. La primera secuencia pertenece a la enzima NF795gpC y la

## ES 2 340 753 A1

segunda a la secuencia de la enzima HisNF795gpC. Esta última enzima se ha construido mediante la adición de una cola de histidinas y un sitio de corte para una proteasa de tabaco en el extremo amino terminal de NF795gpC. Como se muestra en los ejemplos, la enzima correspondiente a la secuencia SEQ ID NO: 2 no presenta disminución en la actividad respecto de la enzima NF795gpC. Además, la enzima alostérica seleccionada puede incluir adiciones de nucleótidos o aminoácidos (modificados o no) en las regiones N-terminal y/o C-terminal así como cualquier eliminación o adición de nucleótidos o aminoácidos (modificados o no) en los sitios internos de su secuencia.

Otro aspecto de la presente invención es el uso del biosensor para la detección de anticuerpos anti-VIH en una muestra biológica.

El término “muestra biológica” se refiere a una muestra aislada que puede proceder de un fluido fisiológico como sangre, plasma, suero u orina y/o cualquier tejido celular procedente de un organismo.

Para la detección de anticuerpos anti-VIH en la muestra biológica, es necesaria la adición de un sustrato adecuado del enzima alostérico que permita determinar de forma indirecta la concentración de anticuerpos unidos a la enzima alostérica modificada en el sentido que se especifica en el método descrito en el párrafo siguiente.

En otro aspecto de la presente invención se provee un método de detección de anticuerpos anti-VIH que comprende:

- a. extraer una muestra biológica,
- b. poner en contacto la muestra biológica de (a) con el biosensor de la invención,
- c. añadir un sustrato de la enzima alostérica a la muestra y el biosensor de (b).
- d. registrar la señal electroquímica generada en el paso (c).

Dependiendo del tipo de muestra biológica será necesario un tratamiento diferente de la misma para que el siguiente paso de este método se muestre efectivo. En estos tratamientos se incluyen las diluciones necesarias para aumentar la efectividad del método.

La incubación ha de llevarse a cabo en un medio óptimo para la actividad enzimática, es decir, con el pH ajustado a las condiciones óptimas en las que la enzima es activa así como el empleo de soluciones tampón que lo mantengan en ese intervalo. La incubación debe realizarse con una dilución óptima de la muestra (aquella que permita mayor sensibilidad en la detección), concentración adecuada de la enzima alostérica modificada y durante el tiempo necesario para que se lleve a cabo la unión de los anticuerpos anti-VIH a los péptidos adicionados a la enzima. En el ejemplo 5 de la presente invención se describen las condiciones de incubación citadas, donde la dilución del suero de las muestras de pacientes infectados con VIH es de 1/320 o 1/60, la concentración de enzima es de 2 mg/L y el tiempo de incubación es de al menos 45 minutos.

En las reacciones químicas en las que intervienen enzimas, reacciones enzimáticas, las moléculas sobre las que actúa la enzima en el comienzo del proceso son denominadas sustratos, y éstas los convierten en diferentes moléculas, los productos. El sustrato se une al sitio activo de la enzima, y se forma un complejo enzima-sustrato. El sustrato por acción de la enzima es transformado en producto y es liberado del sitio activo, quedando libre para recibir otro sustrato. La concentración de sustrato adicionada debe ser como máximo aquella que no llegue a inhibir la acción enzimática.

Tal como se ha descrito en páginas precedentes, la unión de los anticuerpos anti-VIH a los péptidos adicionados a la proteína alostérica, estimula la actividad enzimática, facilitando la unión de un sustrato al centro activo de la enzima. A mayor número de anticuerpos unidos, más cantidad de sustrato es capaz de transformar. El sustrato que se adiciona en este paso debe ser aquel cuyo producto, consecuencia de la reacción enzimática, sea electroactivo.

El término “producto electroactivo” es una especie química electroactiva, es decir, una especie química en solución que se ha formado por una reacción química previa a partir de una sustancia química no electroactiva (sustrato). Esta especie electroactiva puede oxidarse o reducirse, generando de esta manera una corriente de electrones. El registro de esta corriente de electrones se lleva a cabo con las técnicas de detección descritas en el apartado correspondiente. En los ejemplos de la presente invención, el producto electroactivo es el p-aminofenol (PAP) que genera una corriente de electrones al oxidarse.

En una realización preferida el sustrato de la enzima alostérica se selecciona de entre la lista que comprende: ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido), CPRG (clorofenil rojo- $\beta$ -D-galactopiranosido), FDG (Fludesoxiglucosa también conocido como di- $\beta$ -D-galactopiranosido de fluoresceína) o PAPG (p-aminofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido).

Otro aspecto de la presente invención es un kit para la detección de anticuerpos anti-VIH que comprende el biosensor de la invención.

En una realización preferida, el kit comprende además un sustrato de la enzima alostérica. En una realización más preferida de la presente invención, el sustrato de la enzima alostérica incluido en el kit, se selecciona de entre

la lista que comprende: ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido), CPRG (clorofenil rojo- $\beta$ -D-galactopiranosido), FDG (Fludesoxiglucosa también conocido como di- $\beta$ -D-galactopiranosido de fluoresceína) o PAPG (p-aminofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido).

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

### Descripción de las figuras

Fig 1. Muestra las corrientes transitorias observadas en la red de microelectrodos a un potencial constante de 0.37 V.

15

Medida de las corrientes en soluciones que contenían el sustrato sólo a 0.25 mg.ml<sup>-1</sup> (X),  $\beta$ -galactosidasa sola a 2  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> (▲) o tanto sustrato (0.25 mg.ml<sup>-1</sup>) como enzima (2  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) (●) en buffer Z.

20

Fig 2. Muestra las corrientes transitorias medidas a 0.37 V tras una hora de incubación a 28°C.

La incubación se llevó a cabo en presencia de una dilución final 1/60 de suero con anticuerpos anti-HIV. La concentración de sustrato era de 0.25 mg.ml<sup>-1</sup> y 2  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de HisNF795gpC en suero contaminado (■) o no infectado (□) y 0,86  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> HisNF795gpC en suero contaminado (▲) o limpio (Δ). También se llevó a cabo la medida de la corriente transitoria generada por un control con suero pero sin HisNF795gpC (●).

25

Fig 3. Muestra la carga total pasada tras 20 minutos de aplicar 0.37 V a la red de microelectrodos.

Las señales corresponden a la actividad de la HisNF795gpC en contacto con 0.25 mg.ml<sup>-1</sup> de sustrato tras 45 minutos de incubación a 28°C con suero positivo (■) o negativo (□) en anticuerpos anti-HIV.

30

### Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la detección de anticuerpos anti-VIH.

35

#### Ejemplo 1

*Clonación, expresión, purificación y ensayo de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa recombinante HisNF795gpC*

40

La construcción de la  $\beta$ -galactosidasa recombinante marcada con histidina, HisNF795gpC, que presenta el epítipo B de la proteína de la envuelta gp41 del VIH, se basó en la adición por PCR de una cola de histidinas y un sitio de corte de la proteasa del *Tobacco Etch Virus* (que permite la eliminación de las histidinas) en el extremo amino terminal de NF795gpC (Ferrer-Miralles *et al.*, 2001. *J. Biol. Chem.*, 276: 40087-40095). La banda de ADN obtenida por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) fue clonada dentro de los sitios de restricción únicos *NcoI* y *EcoRI* de pNF795gpC, originarios en el vector parental pJLA602 (Schauder *et al.*, 1987. *Gene*, 52: 279-283), dando lugar al vector pHisNF795gpC. Dicho plásmido codifica un enzima modificado bajo el control de los promotores fuertes del fago pL y pR lambda, reprimidos a su vez por el regulador termosensible cI857.

45

La proteína HisNF795gpC fue producida en *E. coli* MC4100 usando procesos estándares (Ferrer-Miralles *et al.*, 2001. *J. Biol. Chem.*, 276: 40087-40095). La células fueron luego concentradas por centrifugación y resuspendidas en tampón Z al cual se había añadido 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, 2 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y pastillas de un cocktail de inhibidores de proteasas (*Complete EDTA-free from Roche Applied Science*). El tampón Z se preparó usando pastillas de PBS (Invitrogen) para obtener un concentración de 0.1 M PBS y completándolo con 1 mM MgSO<sub>4</sub> y 20 mM KCl. Las soluciones se prepararon con agua desionizada de resistividad no inferior a 18 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>. Se utilizó lejía para limpiar el material entre los experimentos. El pH de las soluciones se controló mediante un pHmetro (*METROHM 827 pH Lab meter*) con control de temperatura.

55

Después de sonicar y centrifugar, el sobrenadante fue introducido sobre una columna de níquel (1 ml *HiTrap chelating HP column, GE Healthcare*) equilibrado con el mismo tampón. Luego la columna se lavó con el mismo buffer y las proteínas fueron extraídas mediante un gradiente 10-300 mM de imidazol. La diana de corte de la proteasa incluida después de la cola de histidinas no se ha utilizado en el proceso de purificación porque no se ha considerado necesario dado que la actividad enzimática de la proteína no se afectó por la adición de la cola de histidinas.

60

Las fracciones positivas de proteína fueron detectadas mediante un ensayo miniaturizado de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en microplacas de ELISA, con orto-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido como sustrato. Las fracciones recogidas de proteína fueron dializadas frente a tampón Z. La concentración de proteína se estimó espectrofotométricamente midiendo a 260 y 280 nm. La actividad enzimática se determinó mediante variaciones publicadas del método de Miller (Ferrer-Miralles *et al.*, 2001. *J. Biol. Chem.*, 276: 40087-40095).

65

## Ejemplo 2

*Caracterización de las redes de microelectrodos*

5 Las redes de microelectrodos de capa fina empleadas en este estudio han sido ya descritas en otra parte (Ordeig *et al.*, 2006b. *Electroanalysis*, 18: 247-252, Ordeig *et al.*, 2006c. *Electroanalysis*, 18: 573-578). Estas redes se componen de 128 microdiscos, de 10 micras de diámetro, ordenadas de acuerdo a una red cúbica con una distancia inter-central de 100  $\mu\text{m}$ . Primeramente, los electrodos se limpiaron con etanol y a continuación se activaron electroquímicamente aplicando una serie de pulsos de potencial de 0V a -2V *vs* Ag/AgCl (3M KCl). Luego se caracterizaron los electrodos, mediante voltametría cíclica, en ferrocianuro potásico 1 mM. El análisis de las corrientes limitantes a distintas velocidades de barrido, tal y como se describe en (Ordeig *et al.*, 2006a. *Analyst*, 131: 440-445), permite la elucidación del número de microdiscos activos de la red en cada momento a lo largo de los experimentos. Esta operación se repitió tras cada medida para determinar el grado de pasivación de los microelectrodos. Aunque el rendimiento de los electrodos se vio por lo general afectado por la adsorción de otras proteínas presentes en las suspensiones utilizadas, fue posible recuperar completamente el comportamiento inicial de las redes después de cada ciclo de activación electroquímica en una solución electrolítica limpia.

## Ejemplo 3

20 *La electroquímica del p-aminofenol (PAP) en las redes de microelectrodos*

La detección de los anticuerpos anti-VIH se llevó a cabo de forma indirecta mediante la oxidación del p-aminofenol, PAP, que es producido por la  $\beta$ -galactosidasa a partir de 4-aminofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, PAPG (Niwa *et al.*, 1993. *Anal. Chem.*, 65: 1559-1563; Wollenberger *et al.*, 1994. *Analyst*, 119: 1245-1249). La ventaja de esta aproximación radica en que el PAP se oxida reversiblemente a un potencial moderado (ca. 0.3 V *vs* Ag/AgCl (3M KCl)) y que prácticamente no ensucia el electrodo (Salavagione *et al.*, 2005. *J. Electroanal. Chem.*, 576: 139-145). Sin embargo, el PAP se oxida de acuerdo a un mecanismo EC (Bard y Faulkner, 2000. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2ª Edición, John Wiley & Sons, New York) en el que se produce una primera etapa de transferencia electrónica seguida de una reacción química asociada, además, se sabe que se hidroliza a un rango amplio de pH (Wang *et al.*, 1999. *J. Electroanal. Chem.*, 464: 181-186). Además, encontramos que el p-aminofenol se adsorbió débilmente sobre nuestros electrodos de oro. Ésta es probablemente la causa de la variedad de valores encontrados en la bibliografía para el coeficiente de difusión de esta especie (Niwa *et al.*, 1993. *Anal. Chem.*, 65: 1559-1563; Wang *et al.*, 1999. *J. Electroanal. Chem.*, 464: 181-186; Robinson *et al.*, 1990. *J. Phys. Chem.*, 94: 1003-1005). A partir del análisis de las corrientes limitantes obtenidas en nuestras redes de microelectrodos estimamos un coeficiente de difusión aparente de  $(4.45 \pm 0.45) \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Utilizamos este valor en todos los cálculos de este trabajo. La determinación se llevó a cabo en una solución de tampón Z 0.1 M PBS con 1 mM PAP. De la voltametría decidimos utilizar un potencial de trabajo de 0.37 V *vs* Ag/AgCl (3M KCl) en los experimentos de determinación amperométrica de PAP que siguieron, ya que a este potencial, la oxidación del PAP está controlada puramente por difusión.

40 El límite de detección para el PAP se determinó a partir de las corrientes limitantes medidas a 100  $\text{mV s}^{-1}$ . A esta velocidad de barrido se garantiza la independencia difusional de los microdiscos en la red (Davies y Compton, 2005. *J. Electroanal. Chem.*, 585: 63-82; Davies *et al.*, 2005. *J. Electroanal. Chem.*, 585: 51-62). El límite de detección se estimó en 4  $\mu\text{M}$  a partir del método de la propagación de errores propuesto por Long y Winefordner (1983), ya que ofrece resultados más realistas que el método de las  $3\sigma$  de la IUPAC (Danzer y Currie, 1998. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 70: 993-1014).

## Ejemplo 4

50 *Detección electroquímica de  $\beta$ -galactosidasa salvaje*

La Fig 1 muestra que ni el sustrato ni la  $\beta$ -galactosidasa salvaje producen una respuesta significativa por separado, al potencial de trabajo y durante un tiempo de polarización del electrodo de 20 minutos. Sin embargo, cuando se mezclan, la aparición de PAP resultante de la actividad enzimática puede seguirse con presteza. Para una concentración dada de enzima, la velocidad de reacción está directamente relacionada con la corriente de oxidación del producto generado, que en este caso es PAP. Se toma como velocidad para una concentración de sustrato dada la pendiente inicial de la curva de corriente frente al tiempo. Si se representan las velocidades iniciales medidas a una serie de concentraciones de sustrato, se puede obtener el valor de las constantes  $K_m$  y  $k_{cat}$ . Se estudió la cinética de la enzima conforme a un mecanismo clásico del tipo Michaelis-Menten y se hallaron valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  de ca.  $3.15 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  y  $0.18 \text{ s}^{-1}$  respectivamente.

65

## Ejemplo 5

*Detección de anticuerpos de VIH en suero mediante His-NF795gpC*

5 Debido a que la enzima His-NF795gpC es más inestable que la enzima de tipo salvaje, las medidas se realizaron en buffer Z que contenía BSA al 1% (peso por volumen). Sin embargo, el seguimiento electroquímico de la actividad enzimática continuó siendo factible con las redes de microelectrodos. A concentraciones más elevadas de enzima la corriente cae tras pasar por un máximo. Como no se observaron caídas de corriente a concentraciones bajas de enzima, se sospechó que cuando la concentración de enzima era demasiado elevada se producía un consumo cuantitativo del sustrato. Otros factores capaces de afectar la respuesta del sensor de forma similar son la pasivación de los microelectrodos, causada por la adsorción de proteínas, pero también quizás la inhibición de la enzima. Aunque no puede descartarse la inhibición enzimática, pensamos que ésta es despreciable bajo las condiciones experimentales de esta invención y que la pérdida de corriente puede explicarse en general por una combinación de consumo de sustrato y pasivación del electrodo.

15 Inmediatamente tras la adición de sustrato a la celda electroquímica, se registra la corriente de oxidación de PAP. La incubación de la proteína His-NF795gpC con sueros positivos potenció su actividad en al menos el 56% en todos los casos estudiados. En los ensayos desarrollados con muestras reales se incubaron  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de enzima durante 45 minutos con una dilución final 1/60 de un cóctel de sueros de pacientes infectados con VIH-1.

20 La Fig 3 muestra los resultados del experimento principal, que consistió en incubar la enzima con un banco de diluciones en serie de dos tipos de suero diferentes, procedentes de individuos infectados y de individuos sanos, con la proteína HisNF795gpC. Para cada condición, se realizaron tres medidas que permitieron estimar valores promedio y sus correspondientes barras de error. Empleamos desviaciones estándar combinadas con un nivel de confianza del 95% como medida del error. El reconocimiento de los anticuerpos fue óptimo para una dilución 1/320 de suero. El aumento de la actividad enzimática no fue potenciado por encima de este nivel a partir de este punto de concentración de suero. La coulometría es un método más fiable que la medida de velocidades iniciales de la reacción enzimática o que medir la corriente al cabo de 20 minutos de reacción con el sustrato. La medida de la carga es más precisa y permite trabajar con concentraciones más bajas de enzima y sustrato (Fig 2). El potencióstato empleado en las medidas electroquímicas de los ejemplos era un Autolab PG12 controlado con el programa GPES 4 y conectado a un PC con Windows XP. Una barra de carbón vítreo de 5 cm de largo, 3 mm de diámetro se usó como electrodo auxiliar y un *Metrohm biotrode* Ag/AgCl (3M KCl) como electrodo de referencia. La temperatura de todas las soluciones se controló mediante una celda de doble pared conectada a un baño termostático.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Biosensor que comprende:

- 5
- a. una enzima alostérica con actividad hidrolasa, modificada, al menos, por la adición de un péptido reconocido por anticuerpos anti-VIH,
  - b. un transductor que comprende una matriz con redes de microelectrodos y
  - 10 c. un detector de la señal electroquímica.

2. Biosensor según la reivindicación 1 donde la enzima alostérica es  $\beta$ -galactosidasa.

15 3. Biosensor según la reivindicación 1 donde el péptido es un epítipo de la glicoproteína transmembrana gp41 del virus VIH.

4. Biosensor según la reivindicación 1 donde la enzima alostérica modificada se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

5. Uso del biosensor según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la detección de anticuerpos anti-VIH en una muestra biológica.

25 6. Método de detección de anticuerpos anti-VIH que comprende:

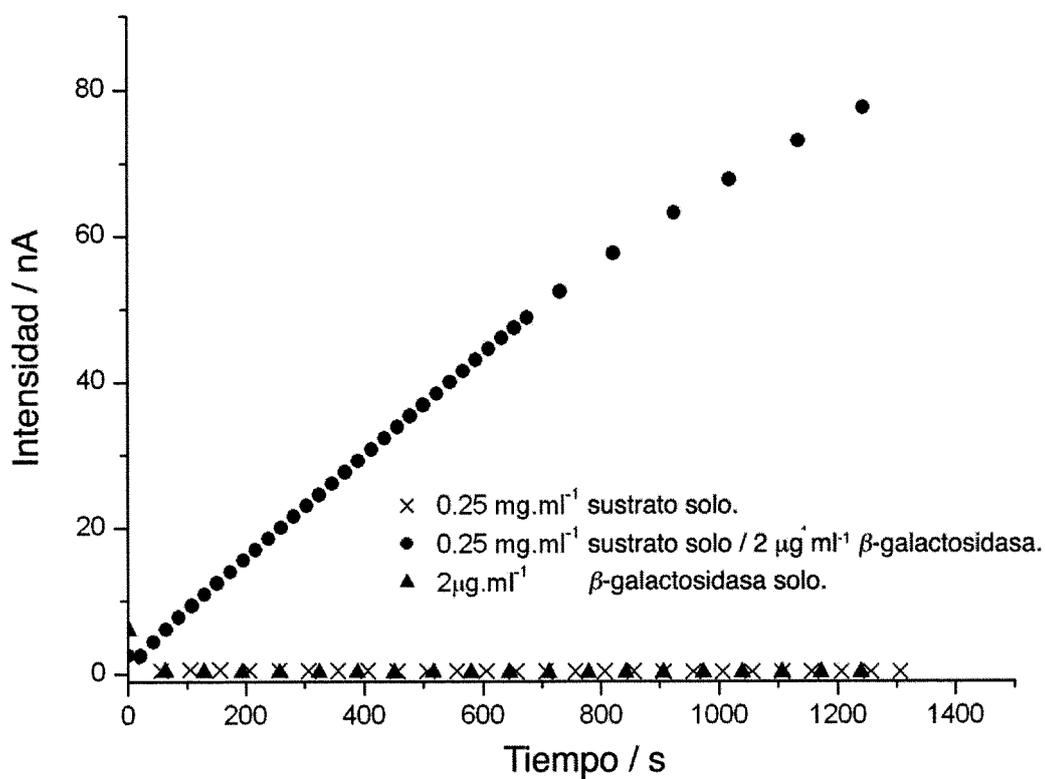
- a. extraer una muestra biológica,
- b. poner en contacto la muestra biológica de (a) con el biosensor de la invención,
- 30 c. añadir un sustrato de la enzima alostérica a la muestra y el biosensor del paso (b) y
- d. registrar la señal electroquímica generada en el paso (c).

35 7. Método según la reivindicación 6 donde el sustrato de la enzima alostérica se selecciona de entre la lista que comprende: ONPG, CPRG, FDG o PAPG.

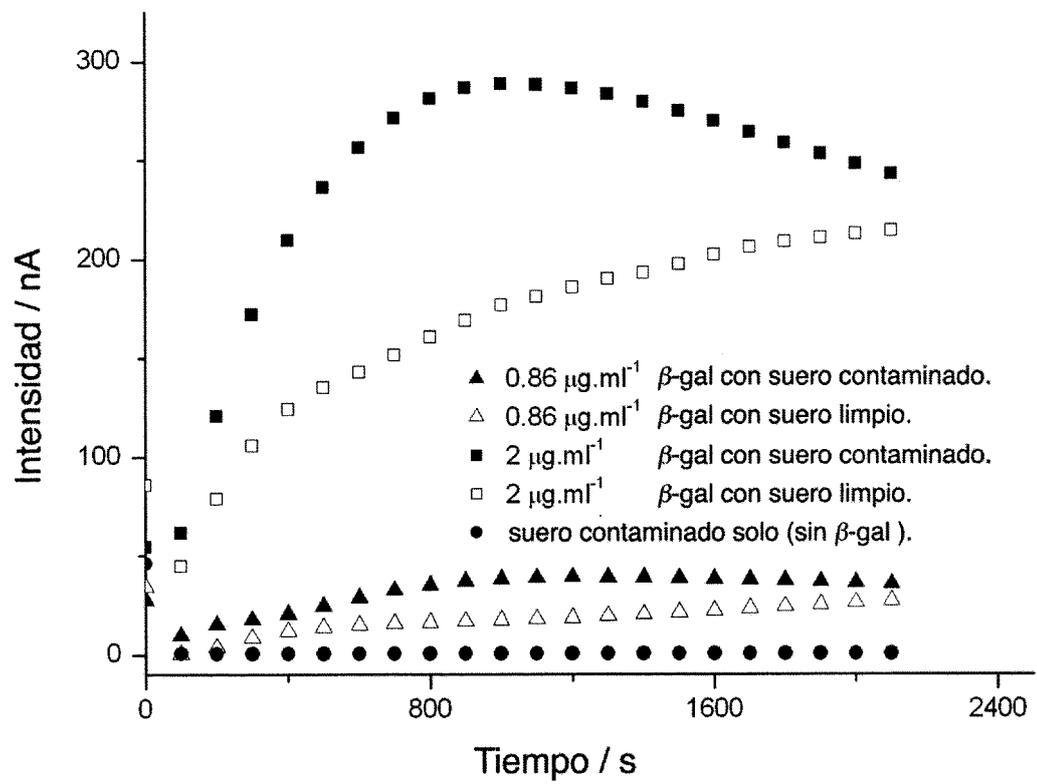
8. Kit para la detección de anticuerpos anti-VIH que comprende el biosensor de la invención.

40 9. Kit según la reivindicación 8 que además comprende un sustrato de la enzima alostérica.

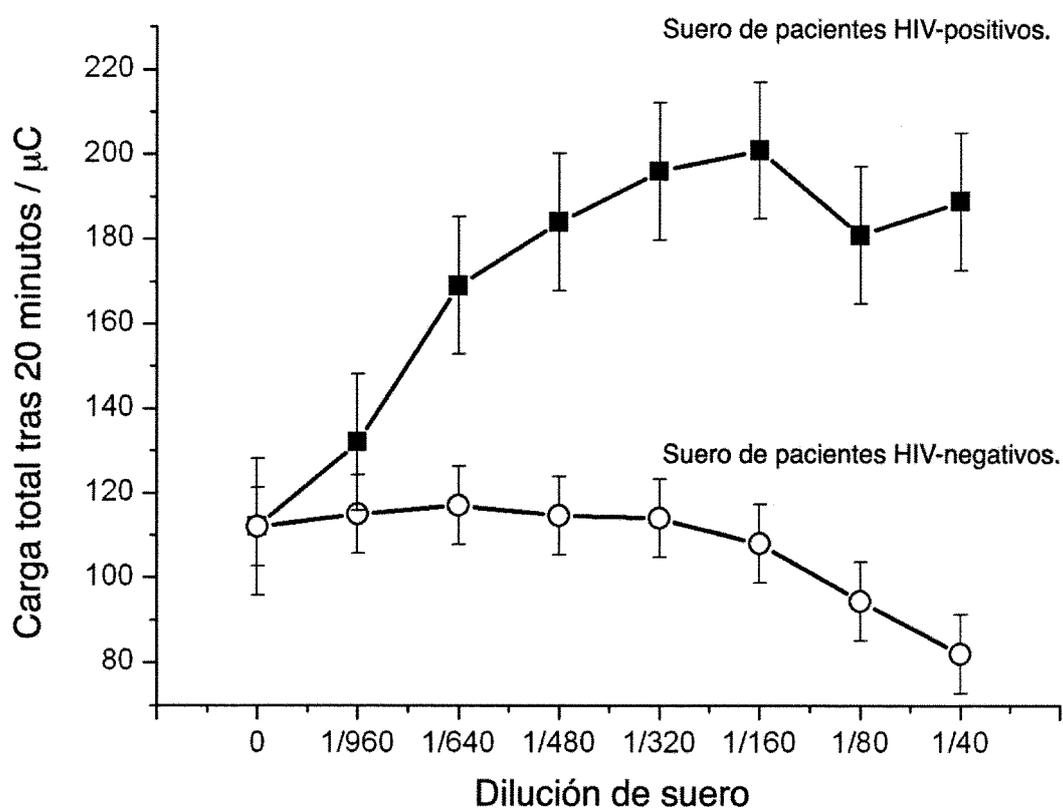
10. Kit según la reivindicación 9 donde el sustrato es seleccionado de entre la lista que comprende: ONPG, CPRG, FDG o PAPG.



**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

# ES 2 340 753 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad Autónoma de Barcelona

5 <120> Biosensor para la detección de anticuerpos anti-VIH

<130> 1641.96

10 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 1072

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220> mat\_peptide

<223> Secuencia de la enzima beta-galactosidasa HisNF795gpc.

Aminoácidos 3 al 8; cola de histidinas (His-tag).

25 Aminoácidos 12 al 18; sitio de reconocimiento de la proteasa.

Aminoácidos 790 al 825; Sitio de reconocimiento para anticuerpos anti-VIH.

<400> 1

30 Met Ala His His His His His His Ser Ser Gly Glu Asn Leu Tyr Phe  
1 5 10 15

35 Gln Gly Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val  
20 25 30

40 Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg  
35 40 45

45 Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser  
50 55 60

50 Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro Ala Pro Glu Ala Val  
65 70 75 80

55 Pro Glu Ser Trp Leu Glu Cys Asp Leu Pro Asp Ala Asp Thr Val Val  
85 90 95

60 Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr  
100 105 110

65 Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Ala Glu  
115 120 125

70 Asn Pro Thr Gly Cys Tyr Ser Leu Thr Phe Asn Ile Asp Glu Ser Trp  
130 135 140

75 Leu Gln Glu Gly Gln Thr Arg Ile Ile Phe Asp Gly Val Asn Ser Ala  
145 150 155 160

ES 2 340 753 A1

Phe His Leu Trp Cys Asn Gly Arg Trp Val Gly Tyr Gly Gln Asp Ser  
 165 170 175  
 5 Xaa Leu Pro Ser Glu Phe Asp Leu Ser Ala Phe Leu Arg Ala Gly Glu  
 180 185 190  
 10 Asn Arg Leu Ala Val Met Val Leu Arg Trp Ser Asp Gly Ser Tyr Leu  
 195 200 205  
 15 Glu Asp Gln Asp Met Trp Arg Met Ser Gly Ile Phe Arg Asp Val Ser  
 210 215 220  
 20 Leu Leu His Lys Pro Thr Thr Gln Ile Ser Asp Phe Gln Val Thr Thr  
 225 230 235 240  
 25 Leu Phe Asn Asp Asp Phe Ser Arg Ala Val Leu Glu Ala Glu Val Gln  
 245 250 255  
 30 Met Tyr Gly Glu Leu Arg Asp Glu Leu Arg Val Thr Val Ser Leu Trp  
 260 265 270  
 35 Gln Gly Glu Thr Gln Val Ala Ser Gly Thr Ala Pro Phe Gly Gly Glu  
 275 280 285  
 40 Ile Ile Asp Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Asp Arg Val Thr Leu Arg Leu  
 290 295 300  
 45 Asn Val Glu Asn Pro Glu Leu Trp Ser Ala Glu Ile Pro Asn Leu Tyr  
 305 310 315 320  
 50 Arg Ala Val Val Glu Leu His Thr Ala Asp Gly Thr Leu Ile Glu Ala  
 325 330 335  
 55 Glu Ala Cys Asp Val Gly Phe Arg Glu Val Arg Ile Glu Asn Gly Leu  
 340 345 350  
 60 Leu Leu Leu Asn Gly Lys Pro Leu Leu Ile Arg Gly Val Asn Arg His  
 355 360 365  
 65 Glu His His Pro Leu His Gly Gln Val Met Asp Glu Gln Thr Met Val  
 370 375 380  
 70 Gln Asp Ile Leu Leu Met Lys Gln Asn Asn Phe Asn Ala Val Arg Cys  
 385 390 395 400  
 75 Ser His Tyr Pro Asn His Pro Leu Trp Tyr Thr Leu Cys Asp Arg Tyr  
 405 410 415  
 80 Gly Leu Tyr Val Val Asp Glu Ala Asn Ile Glu Thr His Gly Met Val

# ES 2 340 753 A1

		420		425		430	
5	Pro Met	Asn 435	Arg Leu Thr	Asp Asp 440	Pro Arg Trp	Leu Pro 445	Ala Met Ser
10	Glu Arg	Val Thr Arg	Met Val 455	Gln Arg Asp	Arg Arg	Asn His 460	Pro Ser Val
15	Ile Ile	Trp Ser Leu	Gly 470	Asn Glu Ser	Gly His 475	Gly Ala Asn	His Asp 480
20	Ala Leu Tyr	Arg Trp 485	Ile Lys Ser	Val Asp 490	Pro Ser Arg	Pro Val 495	Gln
25	Tyr Glu Gly	Gly 500	Gly Ala Asp	Thr Thr 505	Ala Thr Asp	Ile Ile 510	Cys Pro
30	Met Tyr Ala	Arg Val Asp	Glu Asp 520	Gln Pro Phe	Pro Ala 525	Val Pro	Lys
35	Trp Ser Ile	Lys Lys Trp	Leu Ser 535	Leu Pro Gly	Glu Met 540	Arg Pro	Leu
40	Ile Leu Cys	Glu Tyr Ala	His Ala 550	Met Gly Asn	Ser Leu 555	Gly Gly	Phe 560
45	Ala Lys Tyr	Trp Gln 565	Ala Phe Arg	Gln Tyr 570	Pro Arg Leu	Gln Gly 575	Gly
50	Phe Val Trp	Asp Trp Val	Asp Gln 585	Ser Leu Ile	Lys Tyr 590	Asp Glu	Asn
55	Gly Asn Pro	Trp Ser Ala	Tyr Gly 600	Gly Asp Phe	Gly Asp 605	Thr Pro	Asn
60	Asp Arg Gln	Phe Cys Met	Asn Gly 615	Leu Val Phe	Ala Asp 620	Arg Thr	Pro
65	His Pro Ala	Leu Thr Glu	Ala Lys 630	His Gln Gln	Gln Tyr 635	Phe Gln	Phe 640
70	Arg Leu Ser	Gly Arg Thr	Ile Glu Val	Thr Ser 650	Glu Tyr Leu	Phe Arg 655	
75	His Ser Asp	Asn Glu Phe	Leu His Trp	Met Val Ala	Leu Asp 670	Gly Lys	
80	Pro Leu Ala	Ser Gly Glu	Val Pro 680	Leu Asp Val	Gly Pro 685	Gln Gly	Lys

# ES 2 340 753 A1

Gln Leu Ile Glu Leu Pro Glu Leu Pro Gln Pro Glu Ser Ala Gly Gln  
 690 695 700

5
   
Leu Trp Leu Thr Val Arg Val Val Gln Pro Asn Ala Thr Ala Trp Ser  
 705 710 715 720

10
   
Glu Ala Gly His Ile Ser Ala Trp Gln Gln Trp Arg Leu Ala Glu Asn  
 725 730 735

15
   
Leu Ser Val Thr Leu Pro Ser Ala Ser His Ala Ile Pro Gln Leu Thr  
 740 745 750

20
   
Thr Ser Gly Thr Asp Phe Cys Ile Glu Leu Gly Asn Lys Arg Trp Gln  
 755 760 765

25
   
Phe Asn Arg Gln Ser Gly Phe Leu Ser Gln Met Trp Ile Gly Asp Glu  
 770 775 780

30
   
Lys Gln Leu Leu Thr Pro Leu Arg Asp Gln Phe Thr Arg Ala Pro Leu  
 785 790 800

35
   
Asp Asn Asp Ile Gly Val Gly Ser Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg  
 805 810 815

40
   
Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile  
 820 825 830

45
   
Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Ser Ser Glu Ala  
 835 840 845

50
   
Thr Arg Ile Asp Pro Asn Ala Trp Val Glu Arg Trp Lys Ala Ala Gly  
 850 855 860

55
   
His Tyr Gln Ala Glu Ala Ala Leu Leu Gln Cys Thr Ala Asp Thr Leu  
 865 870 875 880

60
   
Ala Asp Ala Val Leu Ile Thr Thr Ala His Ala Trp Gln His Gln Gly  
 885 890 895

65
   
Lys Thr Leu Phe Ile Ser Arg Lys Thr Tyr Arg Ile Asp Gly His Gly  
 900 905 910

70
   
Glu Met Val Ile Asn Val Asp Val Ala Val Ala Ser Asp Thr Pro His  
 915 920 925

75
   
Pro Ala Arg Ile Gly Leu Thr Cys Gln Leu Ala Gln Val Ser Glu Arg  
 930 935 940

80
   
Val Asn Trp Leu Gly Leu Gly Pro Gln Glu Asn Tyr Pro Asp Arg Leu

# ES 2 340 753 A1

	945	950	955	960
5	Thr Ala Ala Cys	Phe Asp Arg Trp Asp	Leu Pro Leu Ser Asp	Met Tyr
		965	970	975
10	Thr Pro Tyr Val	Phe Pro Ser Glu	Asn Gly Leu Arg Cys	Gly Thr Arg
		980	985	990
15	Glu Leu Asn Tyr	Gly Pro His Gln	Trp Arg Gly Asp	Phe Gln Phe As
		995	1000	1005
20	Ile Ser Arg Tyr	Ser Gln Gln	Gln Leu Met Glu	Thr Ser His Arg
	1010	1015	1020	
25	His Leu Leu His	Ala Glu Glu	Gly Thr Trp Leu	Asn Ile Asp Gly
	1025	1030	1035	
30	Phe His Met Gly	Ile Gly Gly	Asp Asp Ser Trp	Ser Pro Ser Val
	1040	1045	1050	
35	Ser Ala Glu Phe	Gln Leu Ser	Ala Gly Arg Tyr	His Tyr Gln Leu
	1055	1060	1065	
40	Val Trp Cys Gln			
	1070			
45	<210> 2			
	<211> 1053			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220> mat_peptide			
	<223> secuencia correspondiente a la enzima beta-galactosidasa NF795gpc.			
	Aminoácidos 790 al 825; Sitio de reconocimiento para anticuerpos anti-VIH			
50	<400> 2			
55	Val Val Leu Gln	Arg Arg Asp Trp	Glu Asn Pro Gly	Val Thr Gln Leu
	1	5	10	15
60	Asn Arg Leu Ala	Ala His Pro Pro	Phe Ala Ser Trp	Arg Asn Ser Glu
		20	25	30
65	Glu Ala Arg Thr	Asp Arg Pro Ser	Gln Gln Leu Arg	Ser Leu Asn Gly
		35	40	45
70	Glu Trp Arg Phe	Ala Trp Phe	Pro Ala Pro Glu	Ala Val Pro Glu Ser
	50	55	60	
75	Trp Leu Glu Cys	Asp Leu Pro Asp	Ala Asp Thr	Val Val Val Pro Ser
	65	70	75	80

ES 2 340 753 A1

Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr  
 85 90 95  
 5  
 Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro Phe Val Pro Ala Glu Asn Pro Thr  
 100 105 110  
 10  
 Gly Cys Tyr Ser Leu Thr Phe Asn Ile Asp Glu Ser Trp Leu Gln Glu  
 115 120 125  
 15  
 Gly Gln Thr Arg Ile Ile Phe Asp Gly Val Asn Ser Ala Phe His Leu  
 130 135 140  
 20  
 Trp Cys Asn Gly Arg Trp Val Gly Tyr Gly Gln Asp Ser Xaa Leu Pro  
 145 150 155 160  
 25  
 Ser Glu Phe Asp Leu Ser Ala Phe Leu Arg Ala Gly Glu Asn Arg Leu  
 165 170 175  
 30  
 Ala Val Met Val Leu Arg Trp Ser Asp Gly Ser Tyr Leu Glu Asp Gln  
 180 185 190  
 35  
 Asp Met Trp Arg Met Ser Gly Ile Phe Arg Asp Val Ser Leu Leu His  
 195 200 205  
 40  
 Lys Pro Thr Thr Gln Ile Ser Asp Phe Gln Val Thr Thr Leu Phe Asn  
 210 215 220  
 45  
 Asp Asp Phe Ser Arg Ala Val Leu Glu Ala Glu Val Gln Met Tyr Gly  
 225 230 235 240  
 50  
 Glu Leu Arg Asp Glu Leu Arg Val Thr Val Ser Leu Trp Gln Gly Glu  
 245 250 255  
 55  
 Thr Gln Val Ala Ser Gly Thr Ala Pro Phe Gly Gly Glu Ile Ile Asp  
 260 265 270  
 60  
 Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Asp Arg Val Thr Leu Arg Leu Asn Val Glu  
 275 280 285  
 65  
 Asn Pro Glu Leu Trp Ser Ala Glu Ile Pro Asn Leu Tyr Arg Ala Val  
 290 295 300  
 70  
 Val Glu Leu His Thr Ala Asp Gly Thr Leu Ile Glu Ala Glu Ala Cys  
 305 310 315 320  
 75  
 Asp Val Gly Phe Arg Glu Val Arg Ile Glu Asn Gly Leu Leu Leu Leu  
 325 330 335  
 80  
 Asn Gly Lys Pro Leu Leu Ile Arg Gly Val Asn Arg His Glu His His  
 340 345 350

# ES 2 340 753 A1

Pro Leu His Gly Gln Val Met Asp Glu Gln Thr Met Val Gln Asp Ile  
 355 360 365

5  
 Leu Leu Met Lys Gln Asn Asn Phe Asn Ala Val Arg Cys Ser His Tyr  
 370 375 380

10  
 Pro Asn His Pro Leu Trp Tyr Thr Leu Cys Asp Arg Tyr Gly Leu Tyr  
 385 390 400

15  
 Val Val Asp Glu Ala Asn Ile Glu Thr His Gly Met Val Pro Met Asn  
 405 410 415

20  
 Arg Leu Thr Asp Asp Pro Arg Trp Leu Pro Ala Met Ser Glu Arg Val  
 420 425 430

25  
 Thr Arg Met Val Gln Arg Asp Arg Asn His Pro Ser Val Ile Ile Trp  
 435 440 445

30  
 Ser Leu Gly Asn Glu Ser Gly His Gly Ala Asn His Asp Ala Leu Tyr  
 450 455 460

35  
 Arg Trp Ile Lys Ser Val Asp Pro Ser Arg Pro Val Gln Tyr Glu Gly  
 465 470 475 480

40  
 Gly Gly Ala Asp Thr Thr Ala Thr Asp Ile Ile Cys Pro Met Tyr Ala  
 485 490 495

45  
 Arg Val Asp Glu Asp Gln Pro Phe Pro Ala Val Pro Lys Trp Ser Ile  
 500 505 510

50  
 Lys Lys Trp Leu Ser Leu Pro Gly Glu Met Arg Pro Leu Ile Leu Cys  
 515 520 525

55  
 Glu Tyr Ala His Ala Met Gly Asn Ser Leu Gly Gly Phe Ala Lys Tyr  
 530 535 540

60  
 Trp Gln Ala Phe Arg Gln Tyr Pro Arg Leu Gln Gly Gly Phe Val Trp  
 545 550 555 560

65  
 Asp Trp Val Asp Gln Ser Leu Ile Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Asn Pro  
 565 570 575

70  
 Trp Ser Ala Tyr Gly Gly Asp Phe Gly Asp Thr Pro Asn Asp Arg Gln  
 580 585 590

75  
 Phe Cys Met Asn Gly Leu Val Phe Ala Asp Arg Thr Pro His Pro Ala  
 595 600 605

ES 2 340 753 A1

Leu Thr Glu Ala Lys His Gln Gln Gln Tyr Phe Gln Phe Arg Leu Ser  
 610 615 620  
 5 Gly Arg Thr Ile Glu Val Thr Ser Glu Tyr Leu Phe Arg His Ser Asp  
 625 630 635 640  
 10 Asn Glu Phe Leu His Trp Met Val Ala Leu Asp Gly Lys Pro Leu Ala  
 645 650 655  
 15 Ser Gly Glu Val Pro Leu Asp Val Gly Pro Gln Gly Lys Gln Leu Ile  
 660 665 670  
 20 Glu Leu Pro Glu Leu Pro Gln Pro Glu Ser Ala Gly Gln Leu Trp Leu  
 675 680 685  
 25 Thr Val Arg Val Val Gln Pro Asn Ala Thr Ala Trp Ser Glu Ala Gly  
 690 695 700  
 30 His Ile Ser Ala Trp Gln Gln Trp Arg Leu Ala Glu Asn Leu Ser Val  
 705 710 715 720  
 35 Thr Leu Pro Ser Ala Ser His Ala Ile Pro Gln Leu Thr Thr Ser Gly  
 725 730 735  
 40 Thr Asp Phe Cys Ile Glu Leu Gly Asn Lys Arg Trp Gln Phe Asn Arg  
 740 745 750  
 45 Gln Ser Gly Phe Leu Ser Gln Met Trp Ile Gly Asp Glu Lys Gln Leu  
 755 760 765  
 50 Leu Thr Pro Leu Arg Asp Gln Phe Thr Arg Ala Pro Leu Asp Asn Asp  
 770 775 780  
 55 Ile Gly Val Gly Ser Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala  
 785 790 795 800  
 60 Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys  
 805 810 815  
 65 Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly Ser Ser Glu Ala Thr Arg Ile  
 820 825 830  
 70 Asp Pro Asn Ala Trp Val Glu Arg Trp Lys Ala Ala Gly His Tyr Gln  
 835 840 845  
 75 Ala Glu Ala Ala Leu Leu Gln Cys Thr Ala Asp Thr Leu Ala Asp Ala  
 850 855 860  
 80 Val Leu Ile Thr Thr Ala His Ala Trp Gln His Gln Gly Lys Thr Leu  
 865 870 875 880

ES 2 340 753 A1

Phe Ile Ser Arg Lys Thr Tyr Arg Ile Asp Gly His Gly Glu Met Val  
 885 890 895  
 5 Ile Asn Val Asp Val Ala Val Ala Ser Asp Thr Pro His Pro Ala Arg  
 900 905 910  
 10 Ile Gly Leu Thr Cys Gln Leu Ala Gln Val Ser Glu Arg Val Asn Trp  
 915 920 925  
 15 Leu Gly Leu Gly Pro Gln Glu Asn Tyr Pro Asp Arg Leu Thr Ala Ala  
 930 935 940  
 20 Cys Phe Asp Arg Trp Asp Leu Pro Leu Ser Asp Met Tyr Thr Pro Tyr  
 945 950 955 960  
 25 Val Phe Pro Ser Glu Asn Gly Leu Arg Cys Gly Thr Arg Glu Leu Asn  
 965 970 975  
 30 Tyr Gly Pro His Gln Trp Arg Gly Asp Phe Gln Phe Asn Ile Ser Arg  
 980 985 990  
 35 Tyr Ser Gln Gln Gln Leu Met Glu Thr Ser His Arg His Leu Leu His  
 995 1000 1005  
 40 Ala Glu Glu Gly Thr Trp Leu Asn Ile Asp Gly Phe His Met Gly  
 1010 1015 1020  
 45 Ile Gly Gly Asp Asp Ser Trp Ser Pro Ser Val Ser Ala Glu Phe  
 1025 1030 1035  
 50 Gln Leu Ser Ala Gly Arg Tyr His Tyr Gln Leu Val Trp Cys Gln  
 1040 1045 1050  
 55  
 60  
 65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 753

② Nº de solicitud: 200802551

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.09.2008**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/34** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	FERRAZ R.M. et al., "Allosteric molecular sensing of anti-HIV antibodies by an immobilized engineered beta-galactosidase" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY (03 septiembre 2007), Vol. 41, Nº. 4, páginas 492-497; ISSN 0141-0229; DOI:10.1016/j.enzmictec.2007.04.001, todo el documento.	1-10
Y	ORDEIG O. et al., "Electroanalysis utilizing amperometric microdisk electrode arrays" ELECTROANALYSIS (octubre 2007) Vol. 19, Nº 19-20 páginas 1973-1986; DOI: 10.1002/elan.200703914, todo el documento.	1-10
Y	FERRAZ COLOMINA R.M., "Development of allosteric biosensors for the diagnosis of infectious diseases" Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. ISBN: B-47797-2008 / 978-84-691-7245-2 [en línea], Junio 2008 [recuperado el 16.12.2009], Recuperado de Internet <URL:http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0925109-122213//rmfc1de1.pdf>, todo el documento.	1-10
Y	VILLAVERDE A., "Allosteric enzymes as biosensors for molecular diagnosis" FEBS LETTERS (06 noviembre 2003) Vol. 554, Nº. 1-2, páginas 169-172; ISSN 0014-5793; DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01160-8, todo el documento.	1-3,5
A	FERRER-MIRALLES N. et al., "Engineering regulable Escherichia coli beta-galactosidases as biosensors for anti-HIV antibody detection in human sera" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (26 octubre 2001) Vol. 276, Nº. 43, páginas 40087-40095; DOI: 10.1074/jbc.M104704200, todo el documento.	1-10

#### 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  
21.05.2010

Examinador  
I. Abad Gurumeta

Página  
1/7



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 753

② Nº de solicitud: 200802551

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.09.2008**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/34** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FERRAZ R.M. et al., "Profiling the allosteric response of an engineered beta-galactosidase to its effector, anti-HIV antibody" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (13 febrero 2004) Vol. 314, Nº. 3, páginas 854-860; ISSN 0006-291X; DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.12.169, todo el documento.	1-10
A	FERRAZ R.M. et al., "High-throughput, functional screening of the anti-HIV-1 humoral response by an enzymatic nanosensor" MOLECULAR IMMUNOLOGY (mayo 2006) Vol. 43, Nº. 13, páginas 2119-2123; ISSN 0161-5890; DOI: 10.1016/j.molimm.2005.12.012, todo el documento.	1-10

#### 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

21.05.2010

Examinador

I. Abad Gurumeta

Página

2/7

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, HCAPLUS, BIOSIS, EMBASE, EMBL ALL, WIPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.05.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-10	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FERRAZ R.M. et al., "Allosteric molecular sensing of anti-HIV antibodies by immobilized engineered beta-galactosidase" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY (03 septiembre 2007), Vol. 41, N°4, páginas 492-497; ISSN 0141-0229; DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.04.001	03-09-2007
D02	ORDEIG O. et al., "Electroanalysis utilizing amperometric micro-disk electrode arrays" ELECTROANALYSIS (octubre 2007) Vol. 19, N°19-20 páginas 1973-1986; DOI: 10,1002/elan. 200703914.	10-2007
D03	FERRAZ COLOMINA R.M., "Development of allosteric biosensors for the diagnosis of infectious diseases" Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. ISBN: B-47797-2008 / 978-84-691-7245-2 [en línea], Junio 2008 [recuperado el 16/12/2009], Recuperado de Internet <URL:http://www.tesisexarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0925109-122213//rmfc1de1.pdf>	06-2008
D04	VILLAVARDE A., "Allosteric enzymes as biosensors for molecular diagnosis" FEBS LETTERS (06 noviembre 2003) Vol. 554, N°. 1-2, páginas 169-172; ISSN 0014-5793; DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01160-8.	06-11-2003
D05	FERRER-MIRALLES N. et al., "Engineering regulable Escherichia coli beta-galactosidases as biosensors for anti-HIV antibody detection in human sera" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (26 octubre 2001) Vol. 276, N°. 43, páginas 40087-40095; DOI: 10.1074/jbc.M104704200.	26-10-2001
D06	FERRAZ R.M. et al., "Profiling the allosteric response of an engineered beta-galactosidase to its effector, anti-HIV antibody" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (13 febrero 2004) Vol. 314, N°. 3, páginas 854-860; ISSN 0006-291X; DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.12.169.	13-02-2004
D07	FERRAZ R.M. et al., "High-throughput, functional screening of the anti-HIV-1 humoral response by an enzymatic nanosensor" MOLECULAR IMMUNOLOGY (mayo 2006) Vol. 43, N°. 13, páginas 2119-2123; ISSN 0161-5890; DOI: 10.1016/j.molimm.2005.12.012	05-2006

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-10, es un biosensor que comprende la enzima alostérica, beta-galactosidasa (reiv. 2 y 4), modificada, al menos por la adición de un péptido reconocido por anticuerpos anti-VIH, concretamente el epítipo de la glicoproteína transmembrana gp41 del virus VIH (reiv. 3); un transductor y un detector de la señal electroquímica (reiv. 1). Es también objeto de la invención el uso del biosensor para detección de anticuerpos anti-VIH (reiv. 5), un método de detección de dichos anticuerpos (reiv. 6 y 7) y un kit para realizar dicha detección (reiv. 8-10).

Hoja adicional

1. NOVEDAD (ART. 6 Ley 11/1986) y ACTIVIDAD INVENTIVA (ART. 8.1 Ley 11/1986).

La proteína NF795gpC, cuya secuencia se reivindica (SEQ ID:1) es conocida en el estado de la técnica (ver documentos D01, D06, D05). Sin embargo, no se ha encontrado ningún documento que divulgue la secuencia primaria de la proteína. Por tanto, se considera que ésta es nueva. Sin embargo, a falta de otros datos que indiquen que la secuencia reivindicada suponga una ventaja técnica, dicha proteína resultaría obvia para un experto en la materia. En consecuencia, la reivindicación 4 carecería de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 de la Ley 11/1986.

En el caso de la proteína HisNF795gpC, cuya secuencia también se reivindica (SEQ ID:2), en la solicitud se indica que esta "enzima se ha construido mediante la adición de una cola de histidinas y un sitio de corte para una proteasa de tabaco en el extremo amino terminal de NF795gpC..." y que "no presenta disminución en la actividad respecto a la enzima NF795gpC". Además, se indica que la enzima alostérica seleccionada puede incluir modificaciones con respecto de la enzima NF795gpC (ver página 9 línea 32- línea 35). Por lo tanto, sabiendo que las modificaciones realizadas no suponen una ventaja técnica, y una vez conocida la secuencia de la proteína NF795gpC, la obtención de la proteína HisNF795gpC resulta evidente para un experto en la materia y consecuentemente, carece de actividad inventiva según el art. 8.1 de la Ley 11/1986.

El documento D01 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-10 de la invención. Este documento divulga un estudio en el que se utiliza la enzima beta-galactosidasa de E. Coli (la proteína NF795gpC) modificada por la adición del epítipo P1 de la glicoproteína gp41 del virus VIH, para el diagnóstico de la enfermedad. El método de diagnóstico se basa en la identificación de anticuerpos anti-HIV en una muestra biológica, en este caso, en suero humano. Dicho método consiste en poner en contacto la enzima con el suero de los pacientes y añadir un sustrato de la enzima (en este caso, el ONPG que al ser hidrolizado por la beta-galactosidasa da un producto coloreado). La actividad de la enzima es medida mediante un espectrofotómetro.

El documento D03 divulga el desarrollo de los biosensores alostéricos en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Concretamente, en este documento se divulga un estudio sobre el biosensor proteico NF795gpC, útil para la detección de anticuerpos anti-VIH. Este biosensor contiene la proteína NF795gpC que es una beta-galactosidasa modificada que contiene el péptido antigénico P1 de la glicoproteína gp41 de VIH insertado entre los residuos 795 y 796 (ver apartados 1.5.2. "Allosteric prototypes" y 4.1. "Protein NF795gpC as a molecular biosensor"). En este estudio se analizan distintos sustratos de la enzima, como son el ONPG, CPRG y FDG, que van a dar una señal (colorimétrica o fluorimétrica) detectable por el detector del biosensor (ver apartado 1.5 "beta-galactosidase as a signal transducer").

La diferencia entre estos dos documentos y el objeto de la invención, es que el transductor comprende una matriz con redes de microelectrodos, que convierte la reacción bioquímica en una señal eléctrica cuantificable. El efecto técnico conseguido con este tipo de transductor es una alta sensibilidad, sencillez en la detección y portabilidad.

Este elemento técnico y el efecto que con él se consigue, ya se encuentra recogido en el documento D02 que describe los microelectrodos como una de las más versátiles herramientas para electroquímica analítica. Las aplicaciones de las redes de microelectrodos se encuentran en el campo biomédico y el medioambiental. Dependiendo del analito a detectar, las redes de microelectrodos pueden modificarse, incorporando grupos específicos o microestructuras en su superficie. Un tipo específico de modificación es la que da lugar a los biosensores mediante la incorporación de moléculas bioactivas, como las enzimas (ver apartado 1. "Introduction", apartado 4. "Applications of Microelectrode Arrays", apartado 4.3.4. "Biosensor Arrays" y apartado 4.3.4.1. "Enzymatic Biosensor Arrays").

Por lo tanto, a partir de la información contenida en los documentos D01 y D03 (considerados por separado) con el documento D02, la invención según se recoge en las reivindicaciones 1-10 de la solicitud, aunque es nueva según el sentido del art. 6 Ley 11/1986, carece de actividad inventiva según lo establecido en el art. 8.1 de la Ley 11/1986.

El documento D04 divulga el uso de diversas enzimas (entre ellas la beta-galactosidasa) como biosensores para el diagnóstico molecular de diversas enfermedades, entre ellas la producida por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En este documento se describen los biosensores como un dispositivo formado por un sistema receptor en el que el componente biológico interacciona específicamente con el analito, y un transductor fisicoquímico que amplifica la señal resultante de dicha interacción. Entre los receptores se incluyen enzimas, anticuerpos, membranas,... y entre los transductores se incluyen electrodos, semiconductores, componentes ópticos, entre otros. En este documento también se sugiere la posibilidad de que se incluyan características adicionales como la miniaturización (microchips) o bajo coste de producción.

Hoja adicional

La diferencia entre este documento y el objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-3 y 5, es que el transductor comprende una matriz con redes de microelectrodos, que convierte la reacción bioquímica en una señal eléctrica cuantificable. El efecto técnico conseguido con este tipo de transductor es una alta sensibilidad, sencillez en la detección y portabilidad.

Este elemento técnico y el efecto que con él se consigue, ya se encuentra recogido en el documento D02, tal y como se ha explicado anteriormente. Por lo tanto, la invención según se recoge en las reivindicaciones 1-3 y 5 de la solicitud, aunque es nueva según el sentido del art. 8.1 de la Ley 11/1986, carece de actividad inventiva según lo establecido en el art. 6 de la Ley 11/1986.