



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: **ES 2 075 803**

② Número de solicitud: 9302615

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/569

G01N 33/577

C12P 21/08

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **17.12.93**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.95**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.10.95

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Oviedo,
representada por el Vicerrector de Investigación
D. Lorenzo Pueyo Casaus
C/ San Francisco, 3
Oviedo, ES**

⑦ Inventor/es: **Méndez García, Francisco Javier;
De los Toyos González, Juan Ramón;
Vázquez Valdés, Fernando;
Fernández Aparicio, Jesús;
Fleites Gutiérrez, Ana y
Hardisson Rumeu, Carlos**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento de la detección de neumolisina.**

⑦ Resumen:

Procedimiento de detección de neumolisina. La detección se lleva a cabo mediante un inmunoensayo (tipo sandwich ELISA directo) en el que se emplean parejas de anticuerpos monoclonales específicos para distintos epitopos de la neumolisina. Uno de ellos se emplea como anticuerpo captura y el otro como anticuerpo de revelado. La captura de neumolisina en muestras biológicas de pacientes en diagnóstica de la presencia de neumococos como agentes responsables de la patología observada. Se reivindica como de nueva y propia invención: La detección de neumolisina en muestras biológicas y la aplicabilidad de anticuerpos monoclonales específicos para la neumolisina en procedimientos de diagnóstico de infecciones neumocócicas.

DESCRIPCION

Procedimiento de detección de neumolisina.

La invención se refiere a un procedimiento de detección de la neumolisina, el cual tiene particular aplicación en el diagnóstico de las infecciones neumocócicas.

Estado de la técnica anterior

a) Introducción

Es conocido que ciertas proteínas actúan como factores de virulencia y que juegan un papel en la patogénesis de las infecciones neumocócicas. Una de ellas es la neumolisina. La primera evidencia de su implicación patogénica fue la observación de que la inmunización experimental con ella proporcionaba prolongación de la supervivencia frente a la infección neumocócica. Estas propiedades protectoras determinan, por otra parte, que la neumolisina sea objeto de investigación para el desarrollo de estrategias preventivas frente a la infección neumocócica; más en concreto, mutantes atóxicos de la neumolisina -neumolisoides- en combinación con otros componentes proteicos del neumococo, constituyen la base de ensayo de nuevas vacunas antineumocócicas con potencial mayor eficacia protectora que la actualmente disponible.

El diagnóstico de la infección neumocócica descansa principalmente en el aislamiento del microorganismo causante (*Streptococcus pneumoniae*) a partir de los especímenes biológicos. El aislamiento microbiológico del neumococo choca con dos importantes limitaciones:

a) la propia autólisis del germen -espontánea o inducida por antibióticos- y
b) la ineludible lentitud operativa que conlleva su crecimiento e identificación in vitro: ≥ 48 horas.

Por otra parte, el diagnóstico serológico es necesariamente lento ya que exige un intervalo de tiempo suficiente para que se induzca una respuesta inmune y requiere pares de muestras de suero espaciadas en el tiempo.

Con objeto de superar estos inconvenientes, se han buscado otros métodos alternativos de diagnóstico, más rápidos, sensibles y específicos. Los métodos que potencial y más ventajosamente reúnen esas condiciones son, hoy por hoy, los que persiguen la rápida detección de componentes de la bacteria en aquellos fluidos corporales y focos de infección en los que el neumococo se hace patogénicamente presente. Estos métodos consisten en inmunoensayos de variada naturaleza: contrainmunolectroforesis, aglutinación y/o coaglutinación, y ELISA. Esto último es, con mucho, el más sensible. (Farrington, M. and Rubenstein, D. 1991. "Antigen detection in pneumococcal pneumonia". J. Infect.23: 109-116; Holloway, Y., Snijder, J.A.M., and Boersma, W.G.1993. "Demonstration of circulating pneumococcal immunoglobulin G immune complexes in patients with community-acquired pneumonia by means of an enzyme-linked immunosorbent assay". J. Clin.Microbiol. 31: 3247-3254)

Estado de la técnica en cuanto a procedimientos de detección de neumolisina

Un diagnóstico antigénico fiable y altamente específico del neumococo ha de estar basado en un componente que:

- 1) Esté presente en todas las cepas aisladas;
- 2) No exhiba diversidad y/o variabilidad antigénicas; y
- 3) Presente epitopos exclusivos, no compartidos -ausencia de reactividad(es) cruzada(s)- con componentes antigénicos de otras especies bacterianas.

Los inmunoensayos arriba mencionados se aplican a la identificación de polisacáridos capsulares o del polisacárido C de la pared celular, ninguno de los cuales reúne todos los criterios exigidos.

Por el contrario, la neumolisina;

- 1) Es un componente comprobado de todos los aislamientos estudiados de neumococo;
- 2) El gen que la codifica exhibe muy reducida variabilidad de secuencia; y
- 3) Presenta epitopos propios, no compartidos con otros miembros de la familia de toxinas bacterianas con las que tiene una alta homología de secuencia génica y aminoacídica, como la estreptolisina O.

La estreptolisina O, producida por *Streptococcus pyogenes*, tiene cierta semejanza inmunológica con la neumolisina. Es también conocido que el gen de la neumolisina comparte con el de la proteína C reactiva humana dos cortas regiones en su secuencia de bases.

El objeto de nuestra invención es la detección de neumolisina especialmente en muestras biológicas de pacientes, a fin de diagnosticar la infección neumocócica, mediante el empleo en un enzimoimmunoensayo de anticuerpos monoclonales específicos. Los anticuerpos empleados no reconocen estreptolisina O o proteína C reactiva humana en las condiciones protocolizadas de ensayo. Por todas las razones apuntadas, nuestro método de diagnóstico goza de especificidad absoluta. Además, es rápido y muy sensible.

Explicación de la invención

a) Breve descripción de la invención

La invención consiste en la detección de neumolisina a partir de muestras biológicas.

Se han generado anticuerpos monoclonales murinos específicos para distintos epitopos de la neumolisina. Algunos de ellos han sido derivatizados en forma biotinilada.

En relación al estado de la técnica anterior, la aplicación de la detección de neumolisina al diagnóstico de enfermedades neumocócicas, es

- 1) Muy rápido, ya que puede ser desarrollado en un plazo inferior a 7 horas;
- 2) Altamente específico para el neumococo, de tal manera que excluye cualquier posibilidad de confusión con otros microorganismos; y
- 3) Muy sensible, ya que permite detectar neumolisina en cantidades del orden del picogramo.

Descripción detallada de la invención

La presencia de neumolisina en los especímenes es puesta de manifiesto por medio de un ensayo ELISA tipo sandwich, que comprende las siguientes fases:

1. preparación de placas de enzimoimmunoensayo con el primer anticuerpo de captura,
2. aplicación de las muestras biológicas,
3. aplicación del segundo anticuerpo biotinilado de revelado, y
4. desarrollo de una reacción cuantificable por

colorimetría.

Ejemplo 1

1) Preparación de las placas

Placas EIA (Costar) de poliestireno, de 96 pocillos con fondo plano, son recubiertas con 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ -pocillo de una solución del primer anticuerpo de captura, en tampón carbonato-bicarbonato (0.05 M pH 9.6). Las placas se incuban a 37 °C durante 6 horas.

Al cabo de este tiempo, se aspira el contenido de los pocillos y se rellenan entonces con 200 μl de una solución de seroalbúmina bovina (1 % peso/volumen) en tampón fosfato 10 mM, con 0.1 % de azida sódica (solución PBS-BSA-AS, pH final 7.3).

Las placas se incuban a 37 °C durante 1 hora y luego se refrigeran, a 4°C, durante, al menos, 12 horas.

2) Realización de la prueba

Una vez preparadas, las placas se lavan 3 veces con tampón fosfato adicionado con Tween 20 al 0.01 % (PBS-T). Se añaden entonces 1 00 μl /pocillo de las muestras biológicas a ensayar y se incuban a 37°C durante 2 horas.

Como antígeno control positivo, una serie de pocillos es incubada con distintas concentraciones de neumolisina recombinante; como control negativo, otra serie lo es con estreptolisina O. Una tercera serie en la que no se deposita antígeno alguno y que se rellena entonces con PBS-BSA-AS, servirá de blanco para la medición final de la densidad óptica.

Las placas se lavan otras tres veces.

Después, se añaden 100 μl /pocillo del segundo anticuerpo monoclonal biotilnado en PBS-BSA-AS. Las placas se incuban durante otras dos horas a 37 °C.

Una vez lavadas las placas, los pocillos se rellenan entonces con 100 μl de ImmunoPure^R streptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Pierce), dilución 1:10.000 en PBS-BSA-T. Se incuban a 37 °C durante dos horas.

Tras el correspondiente lavado, los pocillos se incuban con 100 μl de solución sustrato (OPD (Sigma) y peróxido de hidrógeno en tampón ci-

trato fosfato pH 5.0), a 37 °C durante 30 minutos en la oscuridad.

Finalmente, se mide la absorbancia óptica, por pocillo, a 492 nm (620 nm de referencia), en un lector de placas ELISA.

Se considera como test positivo el correspondiente a aquel pocillo cuya absorbancia sea, aal menos, doble de la correspondiente a los pocillos en los que no se depositó antígeno alguno (blancos).

Un modo de realización de la invención

Aplicando en todo punto el protocolo indicado en el punto anterior, se ensayaron las siguientes concentraciones de neumolisina recombinante: 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 ng/ml. La estreptolisina O (Sigma, S 5265) y la proteína C reactiva humana (ICN Biochemicals, Cat. No. 152315) fueron ensayadas a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

El test no mostró reactividad alguna con 1 μg de estreptolisina O o proteína C reactiva humana. Por el contrario, cantidades ≤ 625 picogramos (mínima cantidad ensayada) de neumolisina fueron claramente detectables.

La Figura 1 muestra la variación de la absorbancia a 492 nm en función de la cantidad ensayada de neumolisina por pocillo.

Los datos arriba mencionados están referidos a preparaciones purificadas de los antígenos implicados. El test resultó también negativo cuando se analizaron sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria (10^{12} CFU ml^{-1}) de *S. pyogenes*; por el contrario, los derivados de cultivos análogos de *S. pneumoniae* (10^8 CFU ml^{-1}) fueron positivos.

Los resultados obtenidos indican que:

- 1) El test propuesto puede ser aplicado a la captura y detección de neumolisina nativa en muestras biológicas de pacientes afectados por infecciones neumocócicas;
- 2) Es específico, ya que excluye la posibilidad de falsos positivos derivados, principalmente, de la detección de estreptolisina O ó proteína C reactiva humana;
- 3) En consecuencia, la detección de neumolisina en una muestra biológica sena señal inequívoca de la presencia, actual o anterior, de

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de neumolisina en muestras biológicas que comprende las siguientes fases:

a/ preparación de placas de enzimoimmunoensayo con un anticuerpo monoclonal de captura específico para la neumolisina

b/ aplicación de las muestras biológicas a ensayar

c/ aplicación de un segundo anticuerpo monoclonal biotinilado específico para la neumolisina, y
d/ desarrollo de una reacción cuantificable por medio de la medida de la absorbancia óptica.

2. Procedimiento de detección de neumolisina, consistente en la aplicación de anticuerpos monoclonales específicos para la neumolisina en un inmunoensayo tipo sandwich ELISA directo, **caracterizado** por:

a/ preparación de placas de enzimoimmunoensayo con 1 μg /pocillo de un anticuerpo monoclonal específico para la neumolisina, que actúa como primer anticuerpo de captura, y

b/ utilización de un segundo anticuerpo monoclonal específico para la neumolisina -distinto del de captura-, empleado en forma biotinilada como anticuerpo de revelado.

5 3. Procedimiento de diagnóstico de infecciones neumocócicas a partir de la detección de neumolisina en muestras biológicas, consistente en la aplicación de anticuerpos monoclonales específicos para la neumolisina en un inmunoensayo tipo sandwich ELISA directo, **caracterizado** por:

10 a/ preparación de placas de enzimoimmunoensayo con un anticuerpo monoclonal de captura, específico para la neumolisina,

15 b/ aplicación de las muestras biológicas a ensayar, c/ empleo de un segundo anticuerpo, específico para la neumolisina y distinto del primero, en forma biotinilada, como anticuerpo de revelado, y

20 d/ desarrollo de una reacción coloreada cuantificable a través de la medida de la absorbancia óptica.

25

30

35

40

45

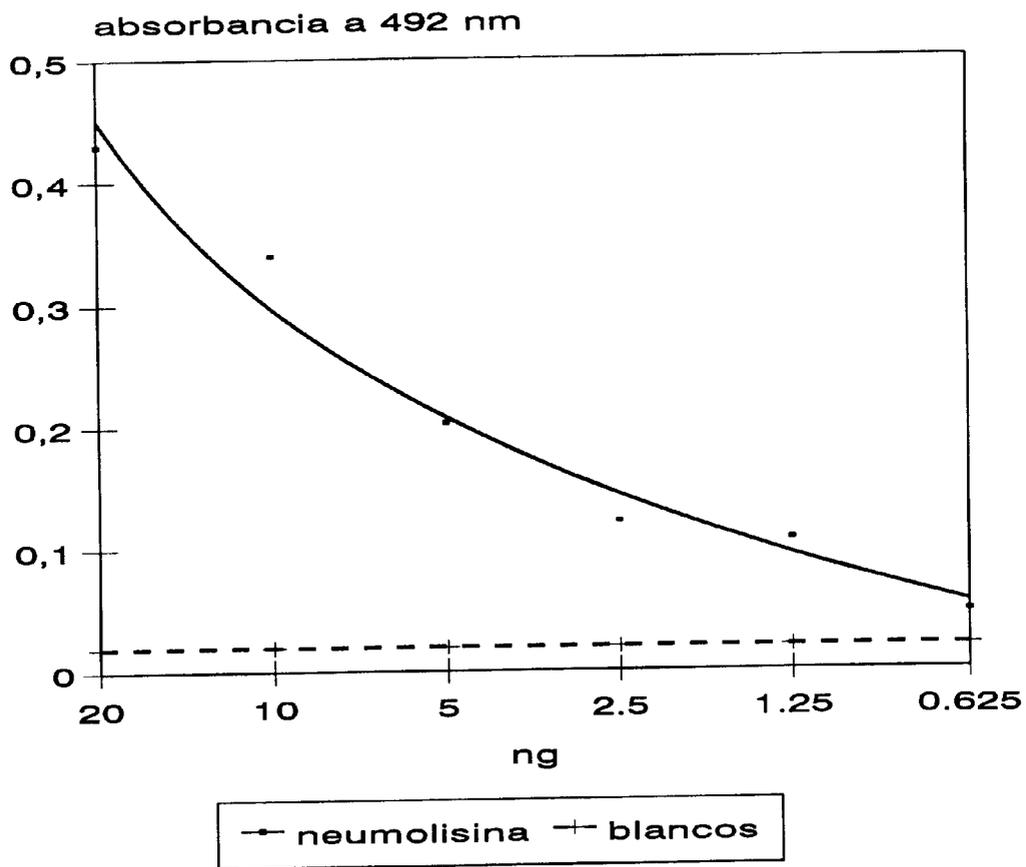
50

55

60

65

Figura 1. Relación entre absorbancia y cantidad detectable de neumolisina





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① ES 2 075 803
② N.º solicitud: 9302615
③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.12.93
④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/569, 33/577, C12P 21/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES-2033266-A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 16.03.93	
A	FR-2674866-A (CHEMUNEX S.A.) 09.10.92	

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 n.º:

Fecha de realización del informe
30.08.95

Examinador
M. Ybarra Fernández

Página
1/1