



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 194 782**

⑤① Int. Cl.⁷: G01N 33/48

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **00967861.6**

⑧⑥ Fecha de presentación: **12.10.2000**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1 232 392**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **21.08.2002**

⑤④ Título: **Procedimiento mejorado de detección de bacterias acidorresistentes del género *Helicobacter* en las heces.**

③⑩ Prioridad: **12.10.1999 EP 99120351**
16.03.2000 EP 00105592
31.03.2000 EP 00107028
10.05.2000 EP 00110110

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
01.12.2003

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
01.12.2003

⑦③ Titular/es:
**Connex Gesellschaft zur Optimierung von
Forschung und Entwicklung
Am Klopferspitz 19
82152 Martinsried, DE**

⑦② Inventor/es: **Reiter, Christian;**
Cullmann, Gerhard;
Heppner, Petra;
Ringeis, Achim;
Müller, Heidemarie y
Haidl, Eva

⑦④ Agente: **Isern Jara, Jorge**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Procedimiento mejorado de detección de bacterias acidorresistentes del género *Helicobacter* en las heces.

5 La invención se refiere a un procedimiento de detección de una infección de un mamífero con una bacteria acidorresistente del género *Helicobacter*, en el que (a) se incuba una muestra de excrementos del mamífero empleando (aa) un receptor en condiciones que permitan la formación de un complejo de un antígeno de la bacteria acidorresistente con el receptor; o (ab) se incuban dos receptores distintos en condiciones que permitan la formación de un complejo de un antígeno de la bacteria acidorresistente con los dos receptores y en el que el receptor según (aa) o los receptores según (ab) se une(n) específicamente a un antígeno que, por lo menos en una parte del mamífero después de haber pasado el tracto intestinal, presenta una estructura que corresponde a la estructura nativa o a la estructura frente a la cual un mamífero produce o genera anticuerpos después de una infección o inmunización con la bacteria acidorresistente o con un extracto o con un lisado de la misma o con un fragmento de la misma o con un péptido sintético; y (b) se detecta la formación de un complejo de antígeno-receptor según (a). La bacteria es con preferencia el *Helicobacter pylori* o el *Helicobacter hepaticus*. Es también preferido que el receptor/los receptores se unan a un epítipo/epítopos (epitopos, determinantes antigénicos) de una catalasa, metaloproteínasa o ureasa. La invención se refiere además a composiciones de diagnóstico y a dispositivos de ensayo que contengan los componentes recién mencionados así como a los envases que contienen dichas composiciones.

La detección de la infección de un organismo de mamífero con un patógeno o parásito microbiano puede realizarse actualmente por diversos métodos invasivos, semiinvasivos o no invasivos. Todos los métodos invasivos presuponen efectuar una endoscopia o una biopsia. Utilizando estas técnicas se lesiona la integridad corporal del afectado, p.ej. con la toma de muestra en caso de una biopsia. La toma de muestras en una biopsia es laboriosa, provoca gastos elevados y por lo general significa una gran molestia para el paciente. La infección con determinados microorganismos, por ejemplo con *H. pylori*, no necesariamente está repartida por toda la mucosa gástrica, por consiguiente, la toma de muestras de una biopsia, si se realiza en una zona no infectada, puede conducir a un resultado negativo falso. Otro inconveniente de los métodos invasivos consiste en la interferencia de tratamientos anteriores con inhibidores de bombas de protones, bismuto o antibióticos en los resultados analíticos.

Las técnicas de diagnóstico semiinvasivas o no invasivas detectan alteraciones en parámetros que puede determinarse sin necesidad de una intervención en el organismo. Para ello se toman muestras y se efectúan análisis con preferencia de líquidos corporales y deposiciones, por ejemplo suero, aire expirado, orina, saliva, sudor o excrementos. En los métodos directos se detecta la presencia del patógeno o del parásito, de sus componentes o de sus productos de descomposición mediante microscopía electrónica, caracterización óptica, determinación de los productos de descomposición radiactiva o por reacciones enzimáticas específicas. Sin embargo, estas técnicas suelen implicar una gran inversión en equipamiento (p.ej. el ensayo respiratorio). En cambio, los ensayos indirectos recurren a la detección de reacciones del organismo hospedante frente al patógeno o al parásito, p.ej. la presencia de anticuerpos contra los antígenos del patógeno en el suero o en la saliva del hospedante.

La intervención en el organismo por técnicas invasivas en la mayoría de casos resulta molesto para el organismo y a menudo conlleva una gran inversión en aparatos y también un riesgo sanitario, en cambio las técnicas no invasivas constituyen la mejor opción por ser métodos que analizan de modo relativamente fácil las muestras de los líquidos corporales y las deposiciones mencionados anteriormente. Además, dado que no todos los hospedantes reaccionan de igual manera frente a un patógeno o parásito determinado y la reacción del hospedante puede iniciarse con retardo y persistir incluso cuando el patógeno o el parásito ya ha sido eliminado del organismo, deberá darse siempre prioridad a los métodos directos. Por consiguiente, de forma ideal se realiza el diagnóstico mediante la detección directa, no invasiva, del patógeno o del parásito en los líquidos corporales o en las deposiciones. A diferencia de los métodos indirectos, esto permite determinar el estado actual de la infección.

Además, un proceso de diagnóstico debería optimizarse en diversos aspectos: los parámetros que aquí convendría considerar son un alto grado de reproducibilidad, la sensibilidad y la especificidad, la disponibilidad garantizada de los materiales a emplear en una calidad constante, unos costes bajos de fabricación y de ejecución así como la aplicación sencilla, independiente de aparatos costosos.

Por las razones aducidas, los procedimientos basados en una gran selectividad y afinidad de fijación de determinados grupos de sustancias (p.ej. anticuerpos, receptores, lectinas, aptámeros) de estructuras moleculares, que pueden elegirse de modo que sean muy específicos de la sustancia a determinar en cada

caso, están adquiriendo una importancia cada vez mayor en el diagnóstico médico. La posibilidad de inmovilizar estas sustancias sobre superficies sólidas así como la fijación de núclidos radiactivos de enzimas que desencadenan reacciones de color con sustratos idóneos o la fijación de partículas coloreadas de afinidad de fijación muy específica (p.ej. en el ensayo ELISA = enzyme linked immunosorbent assay) ha desembocado en el desarrollo de procedimientos de detección de sustancias propias o ajenas al organismo con unos costes más reducidos, una ejecución más sencilla y una menor dedicación de tiempo.

En las fases iniciales del desarrollo de estos procesos de detección se emplearon exclusivamente anticuerpos policlonales. Sin embargo, estos anticuerpos tienen algunos inconvenientes que el experto conoce perfectamente, sobre todo por ejemplo una disponibilidad limitada y a menudo las reactividades cruzadas. La puesta a punto de procedimientos de obtención de anticuerpos monoclonales (Köhler & Milstein (1975)), los avances en el aislamiento de receptores y su expresión dirigida a sistemas de hospedantes celulares, el desarrollo de lectinas de gran afinidad para determinados hidratos de carbono así como el descubrimiento de que las moléculas de ácidos nucleicos monohebras (aptámeros) pueden fijarse específicamente sobre estructuras moleculares, han permitido soslayar en gran parte estos inconvenientes. Actualmente pueden optimizarse con métodos relativamente sencillos la especificidad y la sensibilidad de los procedimientos de detección.

Por su gran especificidad, dichos procedimientos son idóneos para la detección de sustancias individuales definidas, por ejemplo haptenos, péptidos o proteínas, en el supuesto de que el elemento estructural detectado sea constante dentro de la población de muestras a analizar y sea específico de la sustancia a detectar. Son idóneos además para la determinación en líquidos corporales, constituyendo una buena opción para la detección directa de patógenos en esta matriz o conjunto de muestra. En este sentido se han descrito en el estado de la técnica procesos de diagnóstico a partir de los excrementos, p.ej. de la *Entamoeba histolytica* (Haque (1993), J. Infect. Dis. 167, 247-9), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC; Park (1996), J. Clin. Microbiol. 34, 988-990), *Vibrio cholerae* (Hasan (1994) FEMS Microbiol. Lett. 120, 143-148), partículas similares al *Torovirus* (Koopmans (1993), J. Clin. Microbiol. 31, 2738-2744) o *Taenia saginata* (Machnicka (1996), Appl. Parasitol. 37, 106-110).

Los patógenos recién mencionados tienen en común la capacidad de vivir y propagarse en el intestino de su hospedante, en todos los casos en el hombre. Poseen, por tanto, mecanismos que les permiten sobrevivir y multiplicarse en presencia de los sistemas de descomposición y de digestión activos del intestino. Es, pues, probable que en la deposición de los excrementos se ceda una gran cantidad de patógenos o parásitos intactos o casi intactos. Con reactivos de detección, por ejemplo anticuerpos, que reconozcan los parásitos o patógenos intactos, por lo general se podrán detectar fácilmente estos últimos en las heces o en las muestras de heces acondicionadas.

Sin embargo, existe un gran número de patógenos y parásitos que, por un lado por las relaciones existentes entre los tejidos afectados por ellos (p.ej. pulmón, estómago, páncreas, duodeno, hígado) y el tracto gastro-intestinal, pueden aparecer en los excrementos pero, por otro lado, son incapaces de vivir y/o de multiplicarse en el intestino propiamente dicho. Entre estos patógenos y parásitos se encuentran por ejemplo el *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) y el *Helicobacter hepatis*, el *Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias, la *Chlamydia pneumoniae*, la *Legionella pneumophila*, el *Pneumocystis carinii* y otros. Algunos de tales patógenos y parásitos pueden detectarse p.ej. en el esputo, pero por ejemplo la detección del *Mycobacterium tuberculosis* en el esputo solo es posible durante un corto período de tiempo, a saber después de que se haya abierto una de las cavernas que contienen el patógeno. La detección resulta difícil además porque no siempre es posible obtener una muestra de esputo del paciente. Esto afecta p.ej. a bebés, pacientes enajenados o animales. Otros patógenos, por ejemplo la *Legionella pneumophila*, pueden detectarse específicamente gracias a los antígenos que llegan a la orina a través de los riñones. Sin embargo, esto se logra solamente en aquellos casos en los que la cantidad existente en la orina sea suficiente para la detección. La detección en los excrementos sería una alternativa muy conveniente. Sin embargo, en estos organismos el paso por el intestino conlleva un fuerte ataque, debido a los mecanismos de digestión y de descomposición de la flora intestinal. Las estructuras moleculares específicas del patógeno en cuestión pueden resultar destruidas o muy disminuidas en su concentración.

La degradación del patógeno en el intestino constituye también un problema para la detección segura de otras bacterias acidorresistentes en las muestras de excrementos. El número de gérmenes en el estómago de una persona infectada es pequeño si se compara con otras bacterias residentes en el intestino. Además, al salir del estómago los gérmenes y los fragmentos de germen tienen que recorrer un camino muy largo a través de un intestino en el que abundan las proteasas. Estas circunstancias se traducen en que sean muy pequeñas las cantidades de proteínas intactas que pueden recuperarse de las heces, además no se puede asegurar con certeza que sean siempre los mismos fragmentos de determinadas proteínas

los que pasan por el tracto intestinal sin sufrir daño. Esto condiciona además que la combinación de dos epítopes con un antígeno que se requiere para el ensayo ELISA siempre exista necesariamente, como ocurre con la proteína nativa, y los epítopes contiguas tienen una gran probabilidad de dar un resultado positivo en una detección en la que se requieran dos epítopes para la misma molécula. Lo ideal sería que para la detección solamente se necesitara un epítopo para la misma molécula. El reparto individualmente distinto en los antígenos detectados en los excrementos de un infectado apunta además a características individuales de procesamiento de los antígenos durante su paso por el intestino. Un primer intento de delimitar este problema se publicó con el contenido del documento EP-A-0 806 667. En esta solicitud se puso de manifiesto que podían inducirse anticuerpos monoclonales con el lisado de una determinada cepa de *H. pylori* que reconocen un abanico más amplio de cepas procedentes de distintas regiones geográficas. De todos modos, de esta solicitud no se desprende qué antígenos se han reconocido por el suero. En cuanto al hecho de que, a pesar de todos los esfuerzos de normalización, los inmunosueros pueden oscilar, el procedimiento desarrollado en la solicitud recién mencionada tendrá que considerarse como menos óptimo para una aplicación amplia. A ello hay que añadir que para proporcionar sueros policlonales se tienen que inmunizar cada vez más animales nuevos. Los procesos en cuestión exigen mucha dedicación de tiempo y de dinero.

En el documento WO 98/24885 se describe la obtención de anticuerpos monoclonales contra un antígeno de *Helicobacter pylori* con un peso molecular relativamente bajo, a saber 16 ± 2 kDa, y el uso de estos anticuerpos para detectar *H. pylori*. Según WO 98/24885, la detección del *H. pylori* es muy difícil en los excrementos y también en la cavidad bucal. Por ello se considera necesario el desarrollo de procedimientos alternativos de detección de esta bacteria.

En el documento WO 00/26671, que se considera como el estado de la técnica en el sentido del Art. 54(3) de EPC, se describe la detección de organismos acidorresistentes, con preferencia del *H. pylori*, en los excrementos. Según el WO 00/26671, para lograr un diagnóstico válido es necesario incubar una muestra de excrementos de un mamífero que tengan por lo menos dos anticuerpos monoclonales distintos, dirigidos contra diversos antígenos.

Lo ideal sería que fuera posible detectar la infección de un organismo patógeno/parásito acidorresistente, como los mencionados anteriormente, con un único reactivo o con un número limitado de reactivos específicos de dicho organismo patógeno/parásito. Tal opción reduciría notablemente sobre todo los costes del correspondiente proceso de detección. Es, pues, un objetivo de la presente invención el desarrollar un proceso idóneo de detección y los reactivos correspondientes.

Este objetivo se consigue con las formas de ejecución definidas en las reivindicaciones.

La invención se refiere por tanto a un procedimiento de detección de una infección de un mamífero con una bacteria acidorresistente del género *Helicobacter*, en el que (a) se incuba una muestra de excrementos del mamífero empleando (aa) un receptor en condiciones que permitan la formación de un complejo de un antígeno de la bacteria acidorresistente con el receptor; o (ab) se incuban dos receptores distintos en condiciones que permitan la formación de un complejo de un antígeno de la bacteria acidorresistente con los dos receptores y en el que el receptor según (aa) o los receptores según (ab) se une(n) específicamente a un antígeno que, por lo menos en una parte del mamífero después de haber pasado el tracto intestinal, presenta una estructura que corresponde a la estructura nativa o a la estructura frente a la cual un mamífero produce o genera anticuerpos después de una infección o inmunización con la bacteria acidorresistente o con un extracto o con un lisado de la misma o con un fragmento de la misma o con un péptido sintético; y (b) se detecta la formación de un complejo de antígeno-receptor según (a).

El término “microorganismo acidorresistente” en el sentido de la invención abarca cualquier microorganismo que por sus características/mecanismos de adaptación al hospedante resiste las acciones físicas y químicas del tracto digestivo de modo que sea detectable mediante un análisis con preferencia inmunológico o con la intervención de aptámeros. Son ejemplos de dichos microorganismos acidorresistentes el *Helicobacter pylori*, *Helicobacter hepaticum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium pseudotuberculosis* y *Mycobacterium cansassii*.

El término “muestra de heces de un mamífero” significa en el sentido de esta invención cualquier muestra de excrementos que pueda utilizarse para el proceso de detección de la invención. Entre ellas están sobre todo las muestras de excrementos que se han acondicionado con arreglo a métodos conocidos de ensayo diagnóstico. El acondicionamiento o preparación se efectúa por ejemplo con arreglo al inmunoen ensayo enzimático de *Entamoeba* RIDASCREEN® (empresa R-Biopharm, Darmstadt, Alemania).

“Condiciones que permitan la formación de un complejo” son aquellas que el experto puede elegir sin más; ver también Harlow y Lane, ver lugar citado, y son por ejemplo las condiciones fisiológicas.

La expresión “después de pasar por el tracto intestinal posee una estructura que corresponde a la estructura nativa” en el sentido de la presente invención significa que, después de pasar por el intestino, el epítipo de un antígeno es reconocido por un receptor, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, un derivado o fragmento del mismo o el aptámero, obtenido frente al mismo antígeno o el mismo epítipo o que se fija sobre el mismo, que no haya pasado por el tracto intestinal. En otras palabras, el epítipo o el antígeno, unidos específicamente sobre el receptor antes citado, consigue pasar el tracto intestinal sin daño o fundamentalmente sin daño en su estructura y no se degrada. Como fuente de la estructura nativa del epítipo o del antígeno puede utilizarse p.ej. un extracto de bacterias disgregado en una prensa francesa (french press) que se haya purificado posteriormente por los métodos habituales (ver p.ej. Sambrook y col., “Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 2ª edición, 1989, editorial CSH Press, Cold Spring Harbor, EE.UU.) o un lisado bacteriano que se haya purificado posteriormente por el método estándar (p.ej. Sambrook y col., ver lugar citado).

La expresión “después de pasar el tracto intestinal presenta una estructura que corresponde a la estructura contra la que un mamífero produce o genera anticuerpos después de la infección o la inmunización con el microorganismo acidorresistente o un extracto o un lisado del mismo o con una proteína del mismo o con un fragmento del mismo o con un péptido sintético” significa según la invención que el epítipo reconocido por el receptor es un epítipo presentado por el sistema inmune de un mamífero, con preferencia de un hombre. Los mecanismos de presentación de antígeno y los mecanismos que conducen al procesado de antígenos y la multiplicidad de anticuerpos que generan ya son conocidos por el estado de la técnica y se describen por ejemplo en Janeway y Travers, Immunologie Spektrum, 2ª edición, 1997, editorial Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Alemania. Estos epítopos (epitopos, determinantes antigénicos) pueden ser distintos de los epítopos nativos. El contacto del mamífero con los microorganismos o con las proteínas o con los fragmentos o con los péptidos sintéticos puede realizarse mediante infección natural (excepto en el caso de los péptidos sintéticos) o por inmunización. Para la inmunización puede recurrirse a extractos, lisados, péptidos sintéticos, etc. del microorganismo o de la proteína. En el estado de la técnica se conocen ya los esquemas idóneos de inmunización y se describen por ejemplo en Harlow y Lane, ver lugar citado. Los anticuerpos idóneos pueden obtenerse por ejemplo por inmunización y/o rastreo (screening) de sucedáneos, tales como péptidos sintéticos, proteínas de origen recombinante, extractos, lisados o proteínas digeridas parcialmente.

Los “péptidos sintéticos” abarcan aquellos péptidos que presentan por lo menos un epítipo del antígeno nativo o del antígeno que ha pasado por el intestino. Los péptidos pueden tener la misma estructura primaria que el antígeno o fragmentos del mismo. Pero pueden tener también otras estructuras primarias (secuencia primaria de aminoácidos, p.ej. intercambios conservadores).

La expresión “fija específicamente” significa en esta invención que el receptor no muestra ninguna o en lo esencial ninguna reactividad con otros epítopos de las muestras de mamíferos no infectados. Normalmente, el receptor solamente se fija sobre un epítipo de un antígeno que aparece en la muestra de excrementos.

Por ejemplo, en esta forma de ejecución de la invención, una muestra de excrementos acondicionada puede estar fijada sobre una fase sólida y el agente infectante puede detectarse con el receptor existente en forma marcada. En el supuesto de que, después de haber pasado por el tracto intestinal, el antígeno existente esté presente en forma (todavía) (homo)dí- o multímera, el mismo receptor puede utilizarse no solo como captador sino también como detector.

Para el procedimiento de la invención es importante además que, para poder tener éxito en la detección, solo un epítipo de una proteína antigénica tiene que ser detectable de forma consistente después del paso por el intestino. Este epítipo puede hallarse incluso varias veces en un homo-dímero o en homomultímero. La probabilidad de que este epítipo pueda encontrarse en forma detectable es mucho mayor que cuando el ensayo de detección tiene que montarse sobre más de un epítipo detectable.

Finalmente, el procedimiento de la invención, que solamente requiere un receptor, conlleva ventajas de costes y de normalización.

Basándose en el hecho sorprendente según la invención de que determinados antígenos de los microorganismos mencionados después del paso por el intestino presentan una estructura de epítipo en lo esencial detectable de modo consistente, tiene que considerarse además como esencial para la invención

una segunda forma de ejecución. Esta forma de ejecución se basa en que diversos receptores se unen sobre diversos epítopes del mismo antígeno. El término “en lo esencial” significa que el epítope o los epítopes y por lo tanto la infección correspondiente con el microorganismo puede o pueden detectarse en más del 70 % de los afectados, con preferencia por lo menos en el 75 % de ellos, con mayor preferencia en más del 85 %, con preferencia especial en más del 90 %, con preferencia todavía mayor en más del 95 % y con una preferencia muy especial en más del 98 % de los afectados. De forma ideal, las infecciones se detectan en el 100 % de los afectados.

Ahora se ha encontrado de modo sorprendente que con un único receptor, que fija específicamente un epítope de un antígeno de una bacteria acidorresistente del género *Helicobacter*, o con dos receptores, que fijan específicamente dos epítopes del mismo antígeno, se puede efectuar un diagnóstico relativamente seguro de la infección con estas bacterias o patógenos. La invención incluye además formas de ejecución en las que se pueden reconocer otros epítopes, que presentan las propiedades mencionadas, de otros receptores p.ej. de anticuerpos monoclonales o de fragmentos o de derivados de los mismos o de aptámeros. Las últimas formas de ejecución son idóneas para aumentar todavía más la seguridad en el dictado del diagnóstico. Estos receptores adicionales pueden ser con ventaja anticuerpos, fragmentos o derivados, que reconocen específicamente la ureasa, con preferencia la β -ureasa, la proteína de 26 kDa o la Hsp 60, todas ellas con preferencia del *H. pylori*. La detección de una o de varias de estas proteínas o fragmentos de proteína puede efectuarse en el mismo ensayo y en un ensayo independiente con otra porción de la misma muestra.

Los resultados de la presente invención son sorprendentes sobre todo porque el estado de la técnica los había desaconsejado. Por ejemplo, en el caso del *H. pylori* se había encontrado que los principales antígenos no tenían la sensibilidad ni la especificidad deseada para el ensayo ELISA; ver Newell y col., Serodiag. Immunother. Infect. Dis. 3 (1989), 1-6. Por otro lado, en el documento EP-A-0 806 667 se afirma que no es posible la detección segura de infecciones de *H. pylori* con receptores tales como anticuerpos monoclonales debido a la variabilidad genética de las cepas de *H. pylori*.

Frente al estado de la técnica mencionado, el procedimiento de la invención es especialmente ventajoso por cuanto permite un diagnóstico relativamente seguro trabajando solamente con un receptor. Para la detección se utilizan con preferencia, por ejemplo para el ensayo ELISA, pares de receptores, tales como anticuerpos, fragmentos, derivados de los mismos o aptámeros, en ella los dos receptores del par fijan el mismo o distintos epítopes sobre el mismo antígeno. Por ejemplo, la catalasa de *H. pylori* forma estructuras multímeras a partir de varias subunidades iguales. En el ensayo ELISA o en otros ensayos pueden utilizarse por tanto los mismos receptores en calidad de receptores capturadores y también de receptores detectores. Otra ventaja del procedimiento de la invención consiste en su configuración como procedimiento directo y no invasivo, lo cual para el paciente aumenta las facilidades ya mencionadas en la introducción así como la fiabilidad en la determinación del estadio de la enfermedad.

En otra forma de ejecución especialmente preferida, la bacteria es una bacteria de la especie *Helicobacter pylori* o *Helicobacter hepaticum*.

En otra forma preferida de ejecución, el receptor o los receptores es o son anticuerpo(s), fragmento(s) o derivado(s) de ellos o aptámero(s).

Los “fragmentos” o “derivados” de anticuerpos monoclonales en el sentido de esta invención poseen la misma especificidad de fijación que los anticuerpos monoclonales. Tales fragmentos y derivados pueden obtenerse mediante los procedimientos habituales; ver p.ej. Harlow y Lane: “Antibodies, A Laboratory Manual”, editorial CSH Press, Cold Spring Harbor, EE.UU., 1988. Son ejemplos de fragmentos los fragmentos Fab, F(ab')₂ o Fv. Son ejemplos de derivados los fragmentos scFv. Los derivados pueden ser también sustancias obtenidas químicamente que presenten las mismas propiedades de fijación o mejores que los anticuerpos. Tales sustancias pueden obtenerse por ejemplo por peptidomimética o por diversas rondas de “Phage Display” y posterior selección de las que tengan mejores propiedades de enlace. Por aptámeros se entienden según la invención los ácidos nucleicos, por ejemplo el DNA, el ssDNA (ss = monohebra), RNA modificados o ssDNA modificados que fijan un gran número de secuencias diana con gran especificidad y afinidad. El término “aptámero” es conocido por el estado de la técnica y se ha descrito por ejemplo en Osborne y col., Curr. Opin. Chem. Biol. 1 (1997), 5-9, o en Stull y Szoka, Pharm. Res. 12 (1995), 465-483.

El término “complejo antígeno-anticuerpo” en el sentido de esta invención abarca no solo los complejos que el antígeno pueda formar con el anticuerpo nativo, sino también aquellos que pueda formar con fragmentos o con derivados de dicho anticuerpo.

La invención comprende las formas de ejecución en las que se utilizan solamente anticuerpos monoclonales o fragmentos o derivados de los mismos o solamente aptámeros, así como las formas de ejecución en las que, en un ensayo, se emplean diversos tipos de reactivos de detección. Es posible, por ejemplo, utilizar un primer anticuerpo monoclonal con un segundo derivado de anticuerpo o un primer aptámero con un segundo fragmento de anticuerpo, para no citar más que dos ejemplos. En este sentido, los términos “primero” y “segundo” se refieren al primer reactivo de detección y al segundo. Con ello se indica que siempre se utilizan dos anticuerpos, derivados o fragmentos de anticuerpos o siempre dos aptámeros.

El uso de anticuerpos monoclonales, fragmentos o derivados de los mismos o de aptámeros asegura un estándar fácil de mantener en cuanto a la fiabilidad del proceso de diagnóstico, lo cual constituye una gran ventaja frente a los procedimientos de diagnóstico conocidos hasta el presente e implantados con esta finalidad. Se puede prescindir además de la inmunización reiterada, requerida por ejemplo en el procedimiento del documento EP-A-0 806 667, así como de los ensayos posteriores realizados con animales experimentales.

En otra forma preferida de ejecución, el antígeno es el antígeno de una catalasa, con preferencia la del *H. pylori*. La catalasa tiene la ventaja particular de que puede detectarse en todas las bacterias acidorresistentes conocidas hasta ahora. Según la invención pudo lograrse una ventaja adicional, ya que la catalasa es muy resistente a la digestión en el tracto intestinal, lo cual simplifica la detección de cantidades significativas. Finalmente, la catalasa o sus fragmentos están presentes incluso después de pasar por el tracto intestinal a menudo en una estructura todavía de orden superior, p.ej. en forma tetramérica, lo cual facilita la detección cuando se trabaja con solo un tipo de receptor.

Ahora se ha encontrado de modo sorprendente que en una población de mamíferos, en especial de pacientes humanos, cuyas heces se han analizado para detectar infecciones con bacterias acidorresistentes, en lo esencial todos los miembros de esta población presentan de modo consistente en sus excrementos epítopes de catalasa repetitivos, de modo que con gran probabilidad con un solo receptor adecuado, con preferencia con anticuerpos monoclonales, fragmentos o derivados de los mismos o con aptámeros, se puede formular un diagnóstico relativamente seguro. En especial, por el hecho de que la catalasa posee una estructura antigénica tetramérica, este diagnóstico puede formularse con ventaja por ejemplo en un ensayo ELISA o en sistemas fijos de estructura similar.

Es preferido en especial que la catalasa sea la catalasa del *H. pylori*.

En otra forma preferida de ejecución, el antígeno es una metaloproteinasa, con preferencia especial una metaloproteinasa de *H. pylori*.

En otra forma preferida de ejecución, el antígeno es una ureasa, con preferencia de *H. pylori*.

En otra forma preferida de ejecución se utiliza además para la detección una mezcla de receptores, en cuyo caso la mezcla de receptores actúa como capturador del antígeno, cuando el receptor se utiliza como detector del antígeno y la mezcla actúa como detector de antígeno, cuando el receptor se emplea como capturador del antígeno.

Esta forma de ejecución de la invención permite un diagnóstico particularmente seguro, en especial cuando el antígeno no está presente en una conformación dímero o multímera después de haber pasado por el tracto intestinal. Esta forma de ejecución permite que uno de los dos tipos de receptor empleados en la mayoría de procedimientos normalizados de detección inmunológica sea un anticuerpo monoclonal, mientras que el segundo tipo de receptor es por ejemplo un suero policlonal.

En una forma de ejecución especialmente preferida, la mezcla de receptores es un antisuero policlonal.

En una forma de ejecución especialmente preferida adicional, el antisuero policlonal se obtiene frente a un lisado de la bacteria, con preferencia del *H. pylori*.

En otra forma de ejecución especialmente preferida, el lisado es un lisado enriquecido en antígeno.

En otra forma especialmente preferida de ejecución, el lisado es un lisado con menor contenido en antígeno inmunodominante.

Las dos formas de ejecución recién nombradas comprenden además que el lisado sea un lisado enri-

ES 2 194 782 T3

quecido en antígeno, con preferencia enriquecido en catalasa y tenga un contenido menor en antígeno inmunodominante, con preferencia en ureasa que es el antígeno principal. La combinación mencionada permite en especial un buen rendimiento de inmunización y para el procedimiento de la invención un rendimiento de inmunización especialmente idóneo. Una forma de ejecución de los procedimientos de enriquecimiento y de disminución se describe con mayor detalle en los ejemplos.

Según otra forma de ejecución especialmente preferida, el antisuero policlonal se obtiene frente a un antígeno purificado o un antígeno de procedencia (semi)sintética, que es con preferencia un antígeno de catalasa, de ureasa o de metaloproteinasa, con preferencia de *H. pylori*.

Los receptores, con preferencia los anticuerpos monoclonales, los fragmentos o los derivados de los mismos o los aptámeros pueden detectar y fijar específicamente según la invención epítopes lineales o de conformación. En otra forma preferida de ejecución, por lo menos uno de los receptores fija un epítope de conformación.

En una forma de ejecución especialmente preferida, todos los receptores fijan epítopes de conformación.

En una forma especialmente preferida de ejecución, la cadena pesada de un anticuerpo (HP 25.2m 2H10) que fija un epítope de catalasa presenta por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

CDR1: NYWIH
CDR2: YINPATGSTSYNQDFQD
CDR3: EGYDGFDS

En otra forma de ejecución especialmente preferida, la secuencia de DNA que codifica la cadena pesada del anticuerpo (HP 25.2m 2H10) que fija un epítope de catalasa contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

CDR1: AACTACTGGA TTCAC
CDR2: TACATTAATC CTGCCACTGG TTCCAATTCT TACAATCAGG
ACTTTCAGGA C
CDR3: GAGGGGTACG ACGGGTTTGA CTCC

En otra forma preferida de ejecución, la cadena ligera de un anticuerpo (HP 25.2m 2H10) que fija un epítope de catalasa posee por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

CDR1: SASSSVNYMY
CDR2: DTSKLAS
CDR3: QQWSSNPYT

En otra forma de ejecución especialmente preferida, la secuencia de DNA que codifica la cadena ligera del anticuerpo (HP 25.2m 2H10) que fija un epítope de catalasa contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

CDR1: AGTGCCAGCT CAAGTGTA AAA TTACATGTAC
CDR2: GACACATCCA AATTGGCTTC T
CDR3: CAGCAGTGGA GTAGTAATCC GTACACG

En una forma especialmente preferida de ejecución, la cadena pesada de un anticuerpo (HP25.6m/1B5) que fija un epítope de catalasa presenta por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

CDR1: DTYVH
CDR2: KIDPANGKTKYDPIFQA
CDR3: PIYYASSWFAY

En otra forma de ejecución especialmente preferida, la secuencia de DNA que codifica la cadena pesada del anticuerpo (HP25.6m/1B5) que fija un epítope de catalasa contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

ES 2 194 782 T3

CDR1: GACACCTATGTGCAC
 CDR2: AAGATTGATCCTGCGAATGGTAAACTAAATATGACCCGATATTC
 CAGGCC
 5 CDR3: CCCATTTATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCTTAC

En otra forma preferida de ejecución, la cadena ligera de un anticuerpo (HP25.6m/1B5) que fija un epítoto de catalasa posee por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

10 CDR1: KASQDVGTSVA
 CRD2: WTSTRHT
 CRD3: QQYSSSPT

15 En otra forma de ejecución especialmente preferida, la secuencia de DNA que codifica la cadena ligera del anticuerpo (HP25.6m/1B5) que fija un epítoto de catalasa contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

20 CDR1: AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTTCTGTTGCC
 CDR2: TGGACATCCACCCGGCACACT
 CDR3: CAGCAATATAGCAGCTCTCCCACG

25 En otra forma preferida de ejecución, el anticuerpo específico de β -ureasa es el anticuerpo producido de uno de los hibridomas HP8m/4H5-D4-C9 o HP9.1m/3C2-F8-E2 depositados con fecha 23 de junio 1998 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ) con arreglo a las disposiciones del Tratado de Budapest con los números de depósito DSM ACC2360 y DSM AC2362. El anticuerpo HP8m/1H5-G2-B4 específico de β -ureasa que se describen en las figuras se produce a través de un clon "hija" del hibridoma HP8m/4H5-D4-C9 depositado. Los dos anticuerpos producidos mediante el clon "madre" e "hija" se codifican mediante secuencias de DNA idénticas y presentan propiedades idénticas.

30 En otra forma especialmente preferida de ejecución del procedimiento de la invención, la cadena pesada del anticuerpo que fija un epítoto de la β -ureasa contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

35 CDR1: GFTFSSHFMS
 CDR2: SISSGGDSFYPSLKG
 CDR3: DYSWYALDY

40 o bien

CDR1: GYAFSTSWMN
 CDR2: RIYPGDGDTNYNGKFKG
 CDR3: EDAYYSPYSLDY

45 En otra forma de ejecución especialmente preferida, la secuencia de DNA que codifica la cadena pesada del anticuerpo (HP25.6m/1B5) que fija un epítoto de β -ureasa contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

50 CDR1: GG CTACGCATTC AGTACCTCCT GGATGAAC
 CDR2: CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA
 AGTTCAAGGG C
 CDR3: GAG GATGCCTATT ATAGTAACCC CTATAGTTTG GACTAC

55 o bien

60 CDR1: GG ATTCACTTTC AGTAGCCATT TCATGTCT
 CDR2: TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCTAT CCAGACAGTC
 TGAAGGGC
 CDR3: GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA C

En otra forma especialmente preferida de ejecución del procedimiento de la invención, la cadena ligera

ES 2 194 782 T3

del anticuerpo que fija un epítoto de la β -ureasa contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

5 CDR1: RASQSIGTRIH
CDR2: YGSEESIS
CDR3: QQSNTWPLT

o bien

10 CDR1: HASQNINVWLS
CDR2: KASNLHT
CDR3: QQGRSYPLT

15 En otra forma de ejecución especialmente preferida, la secuencia de DNA que codifica la cadena ligera del anticuerpo (HP25.6m/1B5) que fija un epítoto de β -ureasa contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

20 CDR1: A GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGAATAC AC
CDR2: TAT GGTCTGAGT CTATCTCT
CDR3: CAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC G

o bien

25 CDR1: C ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTTGGTTAA GC
CDR2: AAG GCTTCCAAC TGCACACA
CDR3: CAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC G

30 Es especialmente preferido además que las cadenas ligeras y pesadas, que poseen las CDR recién indicados, estén presentes juntas en un anticuerpo, fragmento o derivado de anticuerpo, que fija específicamente la catalasa o la β -ureasa o un fragmento de las mismas, con preferencia de *H. pylori*. Sin embargo, la invención abarca además formas de ejecución, en las que estas cadenas pesadas o ligeras se combinan con otras cadenas ligeras o pesadas, con lo cual las propiedades de fijación en lo esencial pueden mantenerse o mejorarse. Los procedimientos en cuestión ya son conocidos por el estado de la técnica. Los anticuerpos especialmente preferidos, en las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, poseen las secuencias de aminoácidos representadas en las figuras 1 y 2, en las figuras 3 y 4, en las figuras 5 y 6
35 o en las figuras 7 y 8 o bien las secuencias de DNA representadas en ellas codifican dichas regiones. Las CDR pueden integrarse por procedimientos ya conocidos del estado de la técnica en diversas "regiones estructurales" (= FR, framework regions).

40 En una forma preferida de ejecución, antes de la incubación con los anticuerpos, se efectúan con la muestra de heces las etapas siguientes: la muestra de excrementos se resuspende en un tampón de resuspensión en una proporción de 1:3 a 1:25, con preferencia en torno a 1:10 y con preferencia especial de 1:5 y después se mezclan en una mezcladora Vortex. Un tampón de resuspensión puede contener por ejemplo 150 mM de PBS, un 0,1% de SDS. En una forma preferida de ejecución, el tampón de resuspensión consta de 150 mM de PBS, un 0,5% de suero animal y un 0,1% de detergente. El suero de animales puede obtenerse de ternera, de ratón, de rata o de cerdo y el detergente puede elegirse entre los
45 detergentes iónicos (con preferencia especial el Tween 20), no iónicos (con preferencia especial el SDS) o zwitteriónicos (con preferencia especial el CHAPS).

50 En otra forma de ejecución, el proceso de la invención puede aplicarse también a la detección del *H. pylori* en la saliva o en la placa dental. La placa dental se extrae por los métodos ya conocidos del estado de la técnica y puede utilizarse, al igual que la saliva, en una concentración o en una modificación idónea del tampón de resuspensión para la detección según la invención.

55 En otra forma de ejecución, la detección de la formación de complejo antígeno-receptor o del complejo mixto de antígeno-receptor en la etapa (b) mediante un proceso inmunológico.

60 En otra forma preferida de ejecución, la detección de la formación de un complejo antígeno-receptor o del complejo mixto de antígeno-receptor en la etapa (b) mediante ensayos ELISA, RIA, Western Blot o mediante un procedimiento inmunocromatográfico. Tales procedimientos son ya conocidos en el estado de la técnica; ver p.ej. Harlow y Lane, lugar citado.

En otra forma especialmente preferida del procedimiento de la invención se utiliza para el método inmunológico, en especial para el ensayo RIA o ELISA, el mismo receptor para fijar sobre la fase sólida y para detectar el epítipo. El receptor capturador puede fijarse sobre la fase sólida, por ejemplo sobre una placa de microvaloración, en forma sin modificar, mientras que el receptor empleado para la detección está provisto eventualmente de un marcador. Por otro lado, este receptor puede estar también sin marcar y por tanto el epítipo bacteriano puede detectarse mediante un tercer receptor marcado, en cuyo caso este receptor es con preferencia un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo o un aptámero, que puede ser un anticuerpo específico de especie o específico de grupo Ig o un aptámero adecuado. Los marcadores de anticuerpos, por ejemplo los marcadores radiactivos o fluorescentes ya son conocidos por el estado de la técnica; ver p.ej. Harlow y Lane, lugar citado. Lo mismo se diga de los aptámeros. La forma de ejecución descrita anteriormente es especialmente favorable para la detección de catalasa que está presente en forma de tetrámero eventualmente incluso después de haber pasado por el intestino. Obviamente pueden utilizarse también en esta forma de ejecución combinaciones de anticuerpos, fragmentos, derivados y aptámeros, p.ej. combinaciones de anticuerpos, etc. que se fijan sobre diversos epítopes de un mismo antígeno.

Se entiende por un ensayo ELISA de tres etapas un procedimiento consta de una etapa de recubrimiento de la placa ELISA con el anticuerpo capturador, la etapa de adición de la muestra y la etapa de adición del conjugado (por ejemplo de anticuerpo detector marcado) así como de las etapas intercaladas de lavado. El ensayo ELISA de una sola etapa se diferencia del ensayo ELISA de tres etapas porque la adición de la muestra y la adición del conjugado se realiza en una sola etapa sobre la placa ELISA recubierta previamente con el anticuerpo capturador.

En otra forma de ejecución especialmente preferida del procedimiento de la invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de ratón.

Por lo demás, los receptores se hallan fijados en una forma preferida de ejecución sobre un soporte. La fijación de los receptores, con preferencia de los anticuerpos, fragmentos o derivados de los mismos o de los aptámeros, sobre un soporte es especialmente ventajosa para la ejecución de un chequeo rutinario. La combinación anticuerpo-soporte o aptámero-soporte puede envasarse bien en forma de utillaje de ensayo o en forma de kit.

En una forma especialmente preferida de ejecución, el material soporte es un material soporte poroso. En otra forma especialmente preferida de ejecución, el material soporte es una tirilla de ensayo.

En una forma preferida de ejecución, el material soporte consta además de celulosa o de un derivado de celulosa.

El mamífero, cuyos excrementos, etc. pueden analizarse con el procedimiento de la invención, puede ser un animal, por ejemplo un animal doméstico, tal como un gato o un perro, un animal de interés ganadero, p.ej. un cerdo o cualquier otro tipo de animal, por ejemplo un ratón, un tigre, un jerbo o un hurón.

En una forma preferida de ejecución, el mamífero es un hombre.

En otra forma preferida de ejecución, el procedimiento de la invención es un procedimiento automatizado. Un procedimiento automatizado puede ejecutarse por ejemplo con un robot, en cuyo caso el robot ejecuta una parte o la totalidad de las operaciones del procedimiento. Los robots adecuados ya son conocidos por el estado de la técnica.

La invención se refiere además a un anticuerpo monoclonal que fija un epítipo de catalasa, a un fragmento o a un derivado del mismo que posea una región V que presenta una combinación de las CDR representadas anteriormente o se genere o produzca a partir de uno de los hibridomas representados anteriormente.

Es preferido un anticuerpo monoclonal, un fragmento o un derivado del mismo que posea por lo menos una de las regiones V representadas en las figuras 1 y 2, 3 y 4. Este anticuerpo presenta con preferencia dos de las regiones V representadas en las figuras 1 y 2, 3 y 4. Es también preferido que estas regiones V sean codificadas por la secuencias de DNA representadas en las figuras 1 y 2, 3 y 4.

En una forma de ejecución especialmente preferida de la invención, el anticuerpo monoclonal, el fragmento o derivado del mismo es un anticuerpo de ratón o un fragmento o un derivado del mismo o

un anticuerpo quimérico, con preferencia un anticuerpo humanizado o un fragmento o un derivado del mismo. El derivado puede ser también una proteína de fusión. Es también preferido que el anticuerpo esté marcado, por ejemplo con un coloide, con un marcador radiactivo, fluorescente, fosforescente o quimioluminiscente.

5

La obtención de anticuerpos quiméricos humanizados y humanos o de otros derivados es perfectamente conocido por el estado de la técnica (ver p.ej. Vaughan y col., 1998; Orlandi y col., 1989; Harlow y Lane, lugar citado).

10

La presente invención se refiere además al uso de una composición de diagnóstico que contiene un receptor, que fija específicamente un antígeno de una catalasa de *Helicobacter* o una metaloproteinasa de *Helicobacter*, con preferencia un anticuerpo monoclonal, fragmentos o derivados del mismo, ya definidos con anterioridad, fijados eventualmente sobre un material soporte.

15

La presente invención se refiere además a un dispositivo de ensayo para la detección por lo menos de uno de los epítopes definidos anteriormente, que consta de (a) un receptor, que fija específicamente un antígeno de una catalasa de *Helicobacter* o una metaloproteinasa de *Helicobacter*, que es con preferencia un anticuerpo monoclonal, fragmentos o derivados del mismo, ya definidos anteriormente, fijados sobre un material soporte; y (b) un dispositivo para la purificación y análisis de las muestras de excrementos.

20

La invención tiene además como objeto un dispositivo de ensayo que contiene (a) un receptor <ver p. 23>, con preferencia un anticuerpo monoclonal, fragmentos o derivados del mismo, ya definidos anteriormente, el receptor está conjugado con oro coloidal, partículas de látex o bien otras partículas colorantes, cuyo tamaño se sitúa por ejemplo entre 5 nm y 100 nm, con preferencia entre 20 nm y 60 nm (con preferencia especial, una partícula de oro tiene un tamaño de 40 nm a 60 nm y una partícula de látex de 200 nm a 500 nm); y (b) un dispositivo para procesar o purificar y analizar las muestras de heces.

25

30

La presente invención se refiere además a un kit que contiene (a) un receptor <ver p. 23>, que es con preferencia un anticuerpo monoclonal, fragmentos o derivados del mismo, ya definidos anteriormente, fijados eventualmente sobre un material soporte; eventualmente además (b) un dispositivo para procesar y analizar las muestras de excrementos.

35

Como alternativa a los dispositivos para procesar y analizar las muestras de excrementos, las composiciones, dispositivos de ensayo y kits podrán tener también dispositivos para procesar (si fuera necesario) y analizar gases gástricos, condensados respiratorios, saliva, etc.

La invención se refiere finalmente a un envase que contiene la composición de diagnóstico de la invención, el dispositivo de ensayo de la invención o un kit de la invención.

40

Los componentes de la composición de diagnóstico de la invención, del dispositivo de ensayo de la invención y/o del kit de la invención pueden estar envasados en recipientes (envases), por ejemplo frascos o tubos, eventualmente junto con tampones y/o soluciones. En determinadas circunstancias, uno o varios de los componentes pueden estar envasados en un mismo recipiente o envase.

45

En las figuras se presenta lo siguiente.

50

La figura 1 presenta la secuencia de DNA clonado que codifica la región V de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal (HP 25.2m 2H10) específico de la catalasa. La secuencia de aminoácidos codificada se representa en el código monosilábico. Las regiones CDR 1-3 determinadas según Kabat y col. se han destacado con un subrayado.

55

La figura 2 presenta la secuencia de DNA clonado que codifica la región V de la cadena ligera de un anticuerpo monoclonal (HP 25.2m 2H10) específico de la catalasa. La secuencia de aminoácidos codificada se representa en el código monosilábico. Las regiones CDR 1-3 determinadas según Kabat y col. se han destacado con un subrayado.

60

La figura 3 presenta la secuencia de DNA clonado que codifica la región V de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal (HP 25.6m/1B5) específico de la catalasa. La secuencia de aminoácidos codificada se representa también. Las regiones CDR 1-3 determinadas según Kabat y col. se han destacado con un subrayado.

La figura 4 presenta la secuencia de DNA clonado que codifica la región V de la cadena ligera de un

anticuerpo monoclonal (HP 25.6m/1B5) específico de la catalasa. La secuencia de aminoácidos codificada se representa también. Las regiones CDR 1-3 determinadas según Kabat y col. se han destacado con un subrayado.

5 La figura 5 presenta la secuencia de DNA que codifica una cadena ligera de un primer anticuerpo monoclonal (DMS ACC2360) específico de ureasa. También se representa la secuencia de aminoácidos codificada. Las regiones CDR 1-3 determinadas según Kabat y col. se han destacado con un enmarcado.

10 La figura 6 presenta la secuencia de DNA que codifica una cadena ligera de un primer anticuerpo monoclonal (DMS ACC2360) específico de ureasa. También se representa la secuencia de aminoácidos codificada. Las regiones CDR 1-3 determinadas según Kabat y col. se han destacado con un enmarcado.

15 La figura 7 presenta la secuencia de DNA que codifica una cadena ligera de un segundo anticuerpo monoclonal (DMS ACC2362) específico de ureasa. También se representa la secuencia de aminoácidos codificada. Las regiones CDR 1-3 determinadas según Kabat y col. se han destacado con un enmarcado.

La figura 8 presenta la secuencia de DNA que codifica una cadena ligera de un segundo anticuerpo monoclonal (DMS ACC2362) específico de ureasa. También se representa la secuencia de aminoácidos codificada. Las regiones CDR 1-3 determinadas según Kabat y col. se han destacado con un enmarcado.

20 La figura 9 muestra el curso del tratamiento de erradicación en un paciente positivo de *H. pylori* después de la administración de omeprazol, metrodinazol y claritromicina.

Los ejemplos ilustran la invención.

25 Ejemplo 1

Aislamiento de antígenos de H. pylori

1.1 Cultivo de H. pylori

30 Se extendió *H. pylori* (cepa NCTC 11637) en cápsulas petri sobre capas de agar Wilkins añadiendo un 10% de sangre de caballo así como anfotericina B, vancomicina y cefsulodina (Sigma Chemicals) y se incubó a 37°C durante 1-2 días en atmósfera microaerófila (Anaerocult GasPak, Merck). Se suspendió el contenido de 2 cápsulas en 350 ml de medio BHIB añadiendo antibiótico, igual que antes, en un frasco de 1 litro (Schott), se hizo borbotear en el medio durante 4-8 min una mezcla de gases que contiene un 10% de CO₂, un 5% de O₂ y un 85% de N₂ y se cerró el frasco. Se agita el cultivo a 37°C durante 2 días en un agitador circular. A continuación se trasvasó el contenido del frasco en condiciones estériles a un frasco de 10 litros y se llenó con 4,7 litros de medio BHIB. Seguidamente se centrifugó el volumen total durante 15 min con una velocidad de 5000 rpm, se decantó el líquido sobrenadante y se pesó el perdigón de bacterias. Para el almacenaje se resuspendió el perdigón en una solución salina fisiológica añadiendo un 15% de glicerina en una proporción 2:1 (p/v) y se congeló a -80°C. Para comprobar la identidad de las bacterias cultivadas se efectuó una inspección microscópica de las bacterias así como ensayos de la actividad de ureasa, oxidasa y catalasa.

Ejemplo 2

45 *Obtención de antígenos de H. pylori*

Obtención del lisado de H. pylori

50 Al perdigón de bacterias *H. pylori* (ejemplo 1) se le añade PBS, pH 7,5, en proporción 1:10 y se resuspendió en hielo. Se sometieron las bacterias a ultrasonidos con una pequeña sonda (Sonifier, Branson) con una intensidad del 25 - 30%, 10 veces durante 60 s intercalando en cada caso una pausa de 60 s. Se centrifugaron las células bacterianas abiertas 2 veces durante 20 min a 4°C y 10.000 rpm (Sorvall, SS34). Se utilizó el líquido sobrenadante como preparación de antígenos para la producción de antisueros policlonales.

55 *Obtención de catalasa de H. pylori*

60 A un perdigón bacteriano congelado se le añadió en proporción 1:2 (p/v) el tampón de disgregación (20 mM de Tris HCl, pH 7,0, 1 mM de EDTA, 1 mM de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), un 0,05% de azida sódica y un 10% (v/v) de isobutanol) y se agitó a temperatura ambiente (RT) en una mezcladora de sobre la cabeza hasta la descongelación total y después se agitó durante 15 min más. Se centrifugó a 20.000 rpm a 4°C durante 20 min, se decantó el líquido sobrenadante y se filtró a través de

ES 2 194 782 T3

un filtro de 0,45 μm .

Se diluyó el líquido sobrenadante transparente en proporción 1:3 con tampón A (20 mM de Tris HCl, pH 7,0, 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF y un 0,05% de azida sódica) y se trasladó a una columna SourceQ equilibrada con tampón A (16/10) (Pharmacia). El líquido que atraviesa la columna SourceQ contenía la enzima catalasa y estaba libre de los antígenos principales de *H. pylori*, como son ureasa, HSP60 y alquilhidroperóxido-reductasa.

Para aislar la catalasa se sometió el líquido que atravesó la columna SourceQ a una cromatografía a través de tamices moleculares (Superdex 200) (16/60). Con ello se aisló la catalasa junto con otra proteína de un peso molecular de 150 kDa (neutrophil activating protein, NAP), aproximadamente a partes iguales.

Se obtuvo la catalasa en una pureza mayor cuando el líquido que atravesó la columna SourceQ se diluyó con una solución 2 M de acetato sódico, pH 4,9, hasta una concentración de 40 mM de acetato sódico y se introdujo en una columna SourceS (8/28). Después de un lavado con tampón A para eliminar las proteínas no ligadas se eluyó la catalasa con el tampón B (40 mM de acetato sódico, 1 M de NaCl, pH 4,9) empleando un gradiente lineal de NaCl (tampón A más una cantidad del 0% al 100% de tampón B). La catalasa eluye aproximadamente a 370 mM de NaCl.

20 Ejemplo 3

Caracterización de la catalasa

En las condiciones reductoras del SDS-PAGE, la proteína purificada presentaba un peso molecular de unos 58 kDa y una pureza de $\geq 90\%$.

La identificar la proteína aislada se efectuó una microsecuenciación. Se disgregó la proteína en el gel SDS-PAGE con proteasa LysC. La mezcla proteína extraída se separó por cromatografía RP-HPLC. El análisis de la secuencia del péptido LysC arrojó la siguiente secuencia de aminoácidos:

30 ERLHDTIGESLAHVTHK

Esta secuencia es idéntica a la del péptido LysC correspondiente de la catalasa de *H. pylori* (Manos J. y col. (1998) Helicobacter 3(1), 28-38; Genbank Accession n° AAC16068.1).

35 Ejemplo 4

Obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales (pAk; mAk)

Obtención de antiseros policlonales

40 Los antiseros policlonales contra el lisado de *H. pylori*, el lisado de *H. pylori* con menor concentración de antígenos principales, por ejemplo ureasa, HSP60 y alquilhidroperóxido-reductasa (ver ejemplo 2: aislamiento y purificación), el lisado de *H. pylori* con mayor concentración de catalasa (por ejemplo por adición de catalasa al lisado) así como los sueros policlonales contra catalasa purificada pueden obtenerse por inmunización de un animal mamífero seleccionado (p.ej. ratón, conejo, cabra, etc.) con las correspondientes preparaciones inmunogénicas que contienen el epítotope de catalasa.

45 Los anticuerpos pueden purificarse por cromatografía de afinidad con la proteína A a partir de sueros y emplearse como anticuerpos capturadores en el ensayo ELISA sandwich (ver ejemplo 9) para evaluar la idoneidad de los anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos en los excrementos de los pacientes.

50 Los antiseros policlonales de conejo se obtuvieron en la empresa pab Productions (Herbertshausen, Alemania) a partir de lisado de *H. pylori*. A partir de estos antiseros se purificaron anticuerpos policlonales mediante cromatografía de afinidad con la proteína A y se emplearon como anticuerpos capturadores en el ensayo ELISA sandwich (ver ejemplo 9) para evaluar la idoneidad de los anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos en las heces de los pacientes.

Obtención de anticuerpos monoclonales

60 La obtención de anticuerpos monoclonales se realiza por métodos que el experto en la materia ya conoce (Harlow y Lane, 1988; Peters & Baumgarten, 1990).

ES 2 194 782 T3

Inmunización

Las preparaciones de antígeno, obtenidas a partir de lisado de *H. pylori* (ver ejemplo 2), se emplearon para inmunizar ratones (BALB/c x C57/Black, generación F1, edad 8-12 semanas). Como inmunización básica se emulsionaron 50 µg de antígeno 1:1 con adyuvante completo de Freund (Difco) y se inyectaron por vía intraperitoneal (200 µl/ratón). En las renovaciones realizadas a intervalos de 4 meses, los ratones recibieron en cada caso 25 µl de antígeno con adyuvante incompleto de Freund. Con la sangre obtenida de la región retroorbital se preparó el antisuero en forma de control positivo en un ensayo ELISA (ver rastreo de fusión, = fusions-screening).

Fusión

Dos días después de la última inmunización se extrajeron los bazos de los ratones y se fusionaron las células de mieloma P3x63Ag8.653 (ATCC CRL-1580; Kearney y col., 1979) en proporción 5:1 con polietilenglicol 4000. Se suspendieron las células fusionadas en medio HAT (medio de clonación (= medio RPMI 1640, 20 % de FCS, 200 U/ml rhIL-6) con suplemento de hipoxantina-aminopterina-timidina (concentrado 100 x, empresa Sigma) y se extendieron sobre placas con una densidad celular de 2-6x10⁴ células/hoyo en placas de microvaloración de 96 hoyos. El cultivo de los hibridomas se efectúa a 37°C, 5 % de CO₂ y un 95 % de humedad relativa del aire.

Rastreo de fusión (fusions-screening) con ensayo ELISA directo

El rastreo (screening) de los líquidos sobrenadantes de los cultivos que contienen anticuerpos procedentes de hoyos de cultivo (aprox. 10 días después de la fusión) se efectuó en el ensayo ELISA directo en placas de microvaloración de 96 hoyos (MaxiSorb, Nunc):

Las placas ELISA se recubrieron con 2 µ/ml de antígeno de inmunización en tampón carbonato, pH 9,6 (100 µl/hoyo, durante una noche, 5°C). La solución de recubrimiento se eliminó por succión y se bloquearon los sitio de fijación todavía libres con leche desnatada en polvo al 2 % en PBS (p/v) (200 µl/hoyo, 1 h, temperatura ambiente). Después de dos lavados de la placa con PBS, pH 7,3, y con Tween 20 al 0,025 % (v/v) se pipetearon los líquidos sobrenadantes del cultivo de los clones primarios sin diluir a los hoyos (100 µl/hoyo) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Como control positivo se utilizó el antisuero, como control negativo el medio. Después de un nuevo lavado se realizó la detección de los anticuerpos fijados con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (de conejo-anti-ratón Ig-POD (DAKO) en PBS con un 0,1 % de albúmina de suero bovino, 20 min, temperatura ambiente). En la etapa siguiente, la peroxidasa convierte el sustrato de tetrametilbencidina (TMB, Sigma) incoloro en un complejo coloreado. Después de cuatro lavados y de vaciar la placa se añadió una solución de sustrato (K-Blue, Neogen o tampón de ácido cítrico, pH 4,5 con TMB + H₂O₂) y la reacción se interrumpió al cabo de 10 min por adición de ácido sulfúrico 1 N. Los líquidos sobrenadantes de cultivo de clones, que producen anticuerpos específicos de antígenos, presentaban una coloración marcada, frente a los líquidos sobrenadantes del cultivo negativos que eran incoloros.

Establecimiento y cultivo de hibridomas

Los clones positivos se reclonaron dos veces por el principio de la dilución límite, con el fin de obtener monoclonales (Coller & Coller, 1983). La primera reclonación se efectuó en el medio de clonación con suplemento de hipoxantina-timidina (concentrado 100x, Sigma), la segunda en el medio de clonación. Se comprobó la especificidad antigénica de los reclones de nuevo con un ensayo ELISA directo. Se adaptó el clon final en frascos planos con medio de producción (medio RPMI 1640 con un 5 % de FCS de concentración reducida de IgG). Las células se criopreservaron y se produjo líquido sobrenadante de cultivo para la purificación de los anticuerpos.

Ejemplo 5

Caracterización de los anticuerpos de líquidos sobrenadantes de cultivo

De un repertorio de 30 clones específicos (contra el antígeno de inmunización que produce anticuerpos) se eligieron 10 en base a su buena reactividad con las muestras de excrementos de pacientes infectados con *H. pylori* en el ensayo ELISA sandwich (ver tabla 2).

Determinación de isotipos

En los clones establecidos se efectuó en el líquido sobrenadante una determinación de isotipos del anticuerpo monoclonales con la tirilla "Isotyping Kit IsoStrip" (Roche Diagnostics). De este modo se determinaron 8 clones del tipo IgG1 y un clon IgG2a (ver tabla 3).

Western Blot

En el ensayo Western Blot se comprobó la capacidad de los líquidos sobrenadantes de cultivo para reconocer específicamente el antígeno de inmunización. Por gel se hirvieron 15 μg de antígeno purificado en tampón de muestra reductor (Laemmli, 1970) y se extendieron sobre un minigel de SDS-poliacrilamida al 12% (8,6 cm x 7,7 cm x 0,1 cm, Biometra). Después de la separación electroforética en 25-30 mA se inmovilizaron las proteínas (antígenos) con el proceso "Semidry Blot" sobre una membrana de nitrocelulosa.

Se bloqueó la membrana con leche desnatada en polvo al 2% en PBS (30 min, temperatura ambiente) y se lavó tres veces durante 5 min. con TBS/Tween 20 (al 0,2%). Para la siguiente etapa de incubación se tensó la membrana sobre una unidad Accutran Cross-Blot-Screening (Schleicher y Schüll), empleando una placa tipo rejilla de 34 canales transversales. En cada uno de los carriles formados se depositaron 250 μl de TBS/Tween 20 y se añadió en cada caso 250 μl de los líquidos sobrenadantes del cultivo de hibridomas a ensayar. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 2 h, con agitación.

Después de tres lavados con TBS/Tween 20 se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo secundario conjugado de POD (de conejo-anti-ratón Ig-POD, DAKO). Se lavó la membrana tres veces y se visualizó el complejo inmune por adición de la solución de sustrato de 3,3-diaminobencidina (DAB, Sigma). Las bandas de proteína que fijan a los anticuerpos se visualizaron seguidamente mediante un sustrato de peroxidasa insoluble.

6 líquidos sobrenadantes de cultivo de hibridoma presentaban una banda correspondiente a la catalasa (55 kDa), 3 fueron negativos en el ensayo Western Blot, pero tuvieron una reacción positiva con el antígeno nativo en el ensayo ELISA. Probablemente reconocen un epítotope de conformación. Los resultados se recogen en la tabla 3.

Ejemplo 6

Purificación de mAk de líquidos sobrenadantes de cultivos de hibridomas

Se efectúa la purificación de mAk de sobrenadantes de cultivo de hibridomas exentos de suero mediante cromatografía de afinidad con proteína G modificada (Pharmacia Biotech, 1994).

Los líquidos sobrenadantes de cultivo filtrados (0,45 μm) se pasaron directamente a través de una matriz de proteína G. La detección de la proteína en el líquido pasado o en el líquido eluido se realizó por medición de la densidad óptica a 280 nm. Después de una operación de lavado con 150 mM PBS, pH 7,2, hasta alcanzar el valor de fondo de detector se llevó a cabo la elución con 0,1 M glicina/HCl, pH 3,3. La regeneración de la matriz de proteína G se realizó con 0,1 M glicina/HCl, pH 2,7.

Ejemplo 7

40 *Obtención de conjugados**Unión de mAK sobre peroxidasa (POD) para uso en ELISA*

La unión de los mAK sobre la peroxidasa (POD) se lleva a cabo externamente. Los conjugados de poli-POD se adquieren de la empresa MicroCoat (Bernried, Alemania), los conjugados de HPR (horse-raddish peroxidase)-dextrano se adquieren de la empresa DAKO (Copenhague, Dinamarca).

Unión de mAk sobre biotina para uso en el ELISA

Después de la purificación, los anticuerpos monoclonales se biotinizaron para poder utilizarse en el ELISA como anticuerpos de detección. La unión de anticuerpos monoclonales sobre la biotina y POD se realizó por métodos ya conocidos (Harlow & Lane, 1988).

Los anticuerpos monoclonales se conjugaron en una concentración de aprox. 1-2 mg/ml. Antes de la unión, los anticuerpos se retamponaron por diálisis en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 8,3 o bien en tampón hidrogenocarbonato sódico 0,1 M, pH 8,3. Por cada 1 mg de anticuerpo se pipetearon 50 μg de N-hidroxisuccinimidobiotina (NHS-d-Biotin, Sigma) en DMSO y se mezclaron. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se eliminó la NHS-d-biotina sin unir de los anticuerpos biotinilados mediante una diálisis extensiva con PBS 0,15 M, NaN_3 del 0,05%, pH 7,5.

Unión de mAk sobre oro coloidal para uso en un ensayo inmunológico rápido

60 Para el uso en un ensayo inmunológico rápido se conjugó el anticuerpo monoclonal (mAk) con oro coloidal. Tal conjugación se efectuó por métodos estándar ya conocidos (Frens, 1973; Geoghegan y Acker-

ES 2 194 782 T3

man, 1977; Slot y col., 1985). Para la obtención de oro coloidal se calentaron a ebullición 200 ml de una solución de cloruro de oro al 0,01 % (HAuCl_4) y se redujeron también en ebullición con 2 ml de citrato sódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) del 1 %.

5 Para unir los mAk sobre oro coloidal se mezcló la cantidad de IgG necesaria para la estabilización con la solución de oro y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. La concentración óptima de IgG y el valor idóneo del pH para tal unión se determinaron de forma individual para cada mAk. Para estabilizar el conjugado de oro-IgG se añadieron polímeros o proteínas, por ejemplo albúmina de suero bovino (BSA) en una concentración del 1 %, a la mezcla de unión. El oro coloidal no unido a la IgG y la IgG libre se eliminaron seguidamente por centrifugación del conjugado de oro-IgG existente en la mezcla
10 de unión. Para el almacenaje, que se efectúa con preferencia a 4°C, se añadió al tampón de solución del conjugado de oro-IgG la NaN_3 al 0,05 %.

Ejemplo 8

15 *Caracterización de los anticuerpos monoclonales purificados*

Caracterización de las interacciones anticuerpo-antígeno mediante espectroscopía de resonancia de plasmones superficiales (espectroscopía SPR)

20 Con la espectroscopía SPR pueden determinarse las constantes de afinidad de los anticuerpos monoclonales. Con ello pueden hallarse los anticuerpos idóneos para el desarrollo del ELISA y del ensayo rápido.

Ejecución de la espectroscopía de resonancia de plasmones superficiales con el BIAcore de Pharmacia

25 Todas las operaciones se efectuaron con una unidad procesadora BIAcore CA 186 de Pharmacia con arreglo a las instrucciones del fabricante (BIAcore Methods Manual).

30 Para ello se inmovilizó la catalasa mediante unión a una amina en la matriz de dextrano del chip sensor BIAcore CM5. Para activar la matriz de dextrano se pasaron por el chip sensor 45 μl de una mezcla 1:1 de una solución 0,05 M de N-hidroxisuccinimida (NHS) y una solución 0,2 M de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) con un caudal de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. A continuación se fijó la catalasa (35 μl ; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en acetato sódico 10 mM, pH 5,0) sobre la matriz de dextrano. Los ésteres de NHS restantes se desactivaron con etanolamina 1 M (35 μl). La catalasa no unida con enlace covalente sobre la matriz de dextrano se eliminó por regeneración del chip sensor con HCl (10 mM; 15 μl).

35 Por adición de anticuerpos monoclonales específicos de la catalasa, estos se hicieron reaccionar con la catalasa inmovilizada y se determinó el aumento de masa con un detector. Se utilizaron soluciones con distintas concentraciones de anticuerpo, en un intervalo comprendido entre 20 y 670 nM. Estas soluciones se inyectaron en cada caso con un caudal de 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ sobre la catalasa inmovilizada sobre el chip sensor CM5.

40 *Resultados*

A partir de la evolución temporal de la señal de resonancia pueden calcularse los valores de las constantes de velocidad de adsorción (k_{on}) y de desorción (k_{off}) del anticuerpo (software BIAevaluation, versión 3.0). Se comprobaron las afinidades de 6 anticuerpos monoclonales con la catalasa.
45

TABLA 1

50

Resultados de la determinación de afinidad catalasa-mAk			
mAk	k_{on} [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
55 HP25.2m/2H10	1,44E+05	3,90E-05	2,71E-10
HP25.6m/1G4	1,41E+05	2,52E-05	1,79E-10
60 HP25.6m/1B5	5,67E+04	3,86E-05	6,81E-10
HP25.6m/4E3	4,92E+04	5,96E-05	1,21E-09

5	HP25.6m/1A5	3,91E+04	4,77E-05	1,22E-09
	HP25.6m/1H4	7,12E+04	4,12E-05	5,79E-10
10	$K_D = k_{off} : k_{on}$			

Elección de pares de anticuerpos para el uso en el ensayo ELISA de heces humanas

15 De aquellos anticuerpos, que presentan el límite de detección más bajo cuando se determinan a partir del líquido sobrenadante del cultivo, se determinaron los solapamientos de epítopes mediante resonancia de plasmones superficiales y se midieron sus constantes de afinidad. De las combinaciones, que parecían más prometedoras en estas mediciones (sin solapamiento de epítopes, altas constantes de velocidad de adsorción, bajas constantes de velocidad de desorción), se determinaron los límites de detección de antígeno para el ensayo ELISA sandwich aplicado a las heces.

20 Ejemplo 9

Rastreo (screening) de líquidos sobrenadantes de cultivo de mAk en muestras de pacientes (sistema mixto policlonal/monoclonal)

25 De aquellos anticuerpos monoclonales, que en el rastreo de fusión mediante ensayo ELISA directo (ejemplo 4) mostraron un reconocimiento específico de antígeno, se estudió en forma de líquidos sobrenadantes de cultivo su reconocimiento de pacientes y su límite de detección de antígeno en el ensayo ELISA sandwich.

30 Como muestras internas de desarrollo se disponía de muestras de excrementos, cuyo estado de infección (grupo de 0 a 4) se determinó mediante análisis histológico y/o ensayo respiratorio del tipo urea-C¹³. En el ensayo de referencia, los pacientes del grupo 0 presentan un resultado negativo en *H. pylori*, mientras que los pacientes del grupo 4 mostraron un resultado positivo de *H. pylori*.

35 El recubrimiento de las placas ELISA (placas de microvaloración MaxiSorb; Nunc) se efectuó durante una noche a 5°C con 100 µl de una solución de un anticuerpo policlonal de conejo-anti-*H. pylori* (pAk; aprox. 20 µg de IgG/ml de tampón carbonato 0,1 M, pH 9,5). Para bloquear los sitios de unión que todavía quedan libres se pipetearon a cada hoyo 200 µl de PBS 150 mM, pH 7,2 con un 0,2% de gelatina de pescado (p/v) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Después se lavó la placa ELISA 2
40 veces con 250 µl de PBS al que se añadió Tween 20 al 0,025% (tampón de lavado 1). Las heces humanas se suspendieron en proporción 1:1 (p/v) con PBS 150 mM al que se añadió leche desnatada en polvo al 2% y EDTA 1 mM.

45 Para determinar el límite de detección de antígeno, a una suspensión de heces negativa en *H. pylori* se le añadieron 50 ng/ml de catalasa (ver ejemplo 3) y en 1:2 operaciones se diluyó con una suspensión de heces negativa en *H. pylori*. En cada hoyo se incubaron 100 µl de la suspensión de heces (determinación por duplicado en muestras de pacientes). Se vació la placa ELISA, se enjuagó con tampón de lavado 2 (PBS con un 0,2% de Tween 20) y se lavó 4 veces con tampón de lavado 2. A continuación se añadieron 100 µl de líquido sobrenadante de cultivo de hibridomas (diluido 1:5 en PBS) y se incubó a
50 temperatura ambiente durante 60 min. La determinación de los anticuerpos fijados se realizó por adición de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (de conejo-anti-ratón IgG-POD, DAKO). En la etapa siguiente, la peroxidasa hace virar el POD-sustrato de tetrametilbencidina (TMB, Sigma) incoloro añadido a un producto de color azul. Pasados de 5 a 10 minutos, con preferencia después de 10 minutos se interrumpió la reacción enzimática por adición de ácido sulfúrico 1 N (100 µl/hoyo). La intensidad de
55 la reacción de color se midió con un lector ELISA (MWG Spektral). La medición se efectúa a 450 nm frente a la longitud de onda de referencia de 620 nm, con preferencia 630 nm. Antes de la adición del anticuerpo de detección o de la solución de sustrato se lavó la placa ELISA en cada caso 3 veces o 4 veces con tampón de lavado 1.

60 Como límite de detección se establece un valor de extinción que es mayor o igual al doble del valor en blanco (muestra de heces negativa en *H. pylori* sin adición de antígeno).

El anticuerpo monoclonal HP25.2m/2H10 en un ensayo ELISA sandwich empleando un anticuerpo

ES 2 194 782 T3

capturador monoclonal, dirigido contra el lisado de *H. pylori*, mostró una sensibilidad del 68% (de 25 muestras positivas se detectaron correctamente 17) y una especificidad del 82% (de 17 muestras negativas en HP se detectaron 3 muestras positivas falsas). De la tabla 3 se desprende el comportamiento de reconocimiento de pacientes de otros anticuerpos monoclonales (líquidos sobrenadantes de cultivo).

5

TABLA 2

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

HP25.2m/2H10: sensibilidad y especificidad en ELISA sandwich (anticuerpo capturador pAK contra <i>H. pylori</i>)			
Muestra de heces	Estado de infección del paciente	AK capturador: pAK contra HP AK detector: HP25.2m/2H10 (sobrenadante) OD ₄₅₀₋₆₃₀	Corte de evaluación: 0,1 OD ₄₅₀₋₆₃₀ = 0,1
CX0010	POSITIVO	0,25	positivo
CX1014	POSITIVO	0,75	positivo
CX1029	POSITIVO	0,18	positivo
CX1038	POSITIVO	0,09	negativo
CX1052	POSITIVO	0,11	positivo
CX2008	POSITIVO	0,63	positivo
CX2009	POSITIVO	0,32	positivo
CX2016	POSITIVO	0,07	negativo
CX2019	POSITIVO	0,59	positivo
CX2029	POSITIVO	0,52	positivo
CX0213	POSITIVO	0,04	negativo
CX294-1	POSITIVO	0,14	positivo
CX3098	POSITIVO	0,13	positivo
CX3146	POSITIVO	0,05	negativo
CX3148	POSITIVO	0,08	negativo
CX3234	POSITIVO	0,18	positivo
CX4003	POSITIVO	0,17	positivo
CX4006	POSITIVO	0,25	positivo
CXT001	POSITIVO	0,23	positivo
CXT002	POSITIVO	0,53	positivo
CXT003	POSITIVO	0,12	positivo
CXT004	POSITIVO	0,03	negativo
CXT005	POSITIVO	0,03	negativo
CXT006	POSITIVO	0,31	positivo
CXT007	POSITIVO	0,08	negativo
CX1008	NEGATIVO	0,29	positivo
CX1031	NEGATIVO	0,08	negativo
CX1049	NEGATIVO	0,7	positivo
CX1051	NEGATIVO	0,09	negativo
CX0142	NEGATIVO	0,03	negativo
CX0185	NEGATIVO	0,03	negativo
CX0189	NEGATIVO	0,08	negativo
CX0193	NEGATIVO	0,03	negativo

TABLA 2 (continuación)

HP25.2m/2H10: sensibilidad y especificidad en ELISA sandwich (anticuerpo captador: pAK contra H. pylori)			
Muestra de heces	Estado de infección del paciente	AK captador: pAK contra HP AK detector: HP25.2m/2H10 (sobrenadante) OD450-630	Corte de evaluación: 0,1 OD ₄₅₀₋₆₃₀ = 0,1
CX2010	NEGATIVO	0,08	negativo
CX2018	NEGATIVO	0,09	negativo
CX0220	NEGATIVO	0,03	negativo
CX0231	NEGATIVO	0,03	negativo
CX0258	NEGATIVO	0,02	negativo
CX3008	NEGATIVO	0,09	positivo
CX3011	NEGATIVO	0,08	negativo
CX3033	NEGATIVO	0,07	negativo
CX3035	NEGATIVO	0,09	negativo

Abreviaturas: pAK=anticuerpo policlonal; HP= H. pylori

TABLA 3

Caracterización de anticuerpos monoclonales contra catalasa					
Fusión/clon	Isotipo	WB (Ag)	NWG (ng/ml)	Muestras de heces reconocidas correctamente	
				Muestras pos.	Muestras neg.
HP25.2m/2H10	IgG2a, κ	+	1,5	17 de 25	14 de 17
HP25.6m/1G4	IgG1, κ	+	1,5	4 de 5	2 de 2
HP25.6m/1B5	IgG1, κ	+	3-6	3 de 5	2 de 2
HP25.6m/1H4	IgG1, κ	+	3-6	2 de 5	2 de 2
HP25.6m/4E3	IgG1, κ	+	6	2 de 5	2 de 2
HP25.6m/1A5	IgG1, κ	+	6	2 de 5	2 de 2
HP25.6m/5E4	IgG1, κ	-	1,5	1 de 5	2 de 2
HP25.6m/4A12	IgG1, κ	-	1,5	1 de 5	2 de 2
HP25.6m/5F4	IgG1, κ	-	1,5	1 de 5	2 de 2

Abreviaturas: Ag=antígeno; WB=Westernblot; NWG=límite de detección

45 *Resultados*

La tabla 3 recoge los resultados de la determinación de isotipo, de los análisis Westernblot, de la determinación del límite de detección y del reconocimiento de paciente para anticuerpos monoclonales (mAK) contra la catalasa. De los datos se desprende que un buen reconocimiento de la catalasa nativa con mAK no guarda relación con un buen reconocimiento del paciente.

En el ensayo ELISA sandwich mixto, policlonal/monoclonal, el mAK HP25.2m/2H10 presentó una sensibilidad del 68 % y una especificidad del 82 %. Cabe esperar una mejora de la sensibilidad y de la especificidad con el uso de mAK purificado (en lugar de sobrenadante de cultivo) en un sistema ELISA exclusivamente monoclonal. Para ello pueden utilizarse ya sea un anticuerpo monoclonal, dirigido contra el mismo epítipo del antígeno (ver ejemplo 10), ya sea dos anticuerpos monoclonales distintos, dirigidos contra distintos epítopos del mismo antígeno (ver ejemplo 12), en calidad de anticuerpos captadores y detectores.

Ejemplo 10

60 *Detección de H. pylori en heces humanas mediante el ensayo ELISA (sistema exclusivamente monoclonal)*

Para el ensayo se disponía de muestras de excrementos de pacientes de diez clínicas distintas o de

ES 2 194 782 T3

consultas médicas gastroenterológicas, cuyo estado de infección con *H. pylori* se había determinado por ensayo respiratorio de urea-C¹³ y/o análisis histológicos de biopsias gástricas. Las muestras de excrementos a analizar se codificaron de modo que el personal del laboratorio no conocía de antemano el estado de infección.

5 *Ensayo ELISA sandwich de heces con H. pylori (ELISA de tres etapas)*

El recubrimiento de las placas ELISA (MaxiSorb; Nunc) se efectuó a 37°C durante 1 h con 100 µl de una solución de mAK (20,0 µg de HP25.2m/2H10 / ml de tampón carbonato 0,1 M, pH 9,5). Para bloqueo de los sitios de fijación todavía libres se pipetearon a cada hoyo 200 µl de PBS 150 mM con un 0,2% de gelatina de pescado (p/v) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación se realizó un doble lavado con 250 µl del tampón de lavado 1 (PBS con un 0,025% de Tween). Se suspendieron los excrementos humanos en proporción 1:10 (p/v) con 150 mM de PBS añadiendo leche desnatada en polvo al 2% y EDTA 1 mM. Para determinar el límite de detección del antígeno se añadió catalasa de *H. pylori* en concentraciones conocidas a la suspensión de excrementos de un paciente negativo en *H. pylori*. Se centrifugaron las suspensiones de muestras de heces a 7000 rpm durante 5 min. Se incubó en cada hoyo 100 µl del sobrenadante durante 1 h. Se vació la placa, se enjuagó y se lavó 4 veces con solución de lavado 2 (250 µl de PBS al que se añadió un 0,2% de Tween). A continuación se añadieron 100 µl de una solución de mAK unido a biotina (1 µg/ml de HP25.2m/2H10-Bio en PBS; 0,1% de BSA) y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min. La detección de los antígenos unidos se realizó por adición de un conjugado de estreptavidina con POD (Dianova). La POD hace virar en una primera etapa el sustrato incoloro TMB (Sigma) a un producto azul. Pasados de 5 a 10 minutos, con preferencia 10 minutos, se interrumpió la reacción enzimática por adición de ácido sulfúrico 1N (100 µl/hoyo). La intensidad de la reacción de color se midió en un lector ELISA (MWG Spektral). La medición se realiza a 455 nm frente a la longitud de onda de referencia de 620 nm, o de 630 nm.

TABLA 4

Detección de catalasa de H. pylori en heces mediante ensayo ELISA empleando el anticuerpo monoclonal HP25.2m/2H10 como anticuerpo capturador y detector

Paciente	Estado clínico	ELISA heces HP OD(450-630)
1001	negativo	0,069
1002	negativo	0,104
1007	negativo	0,053
1008	negativo	0,042
1010	negativo	0,043
1012	negativo	0,055
1017	negativo	0,052
1021	negativo	0,045
1022	negativo	0,068
1024	negativo	0,036
1025	negativo	0,046
1027	negativo	0,057
1030	negativo	0,061
1031	negativo	0,037
1032	negativo	0,056
1034	negativo	0,048
1035	negativo	0,033
1040	negativo	0,037
1046	negativo	0,046
2002	negativo	0,056
2006	negativo	0,032
2007	negativo	0,027
2010	negativo	0,039
2012	negativo	0,041
2013	negativo	0,049
2014	negativo	0,046
2015	negativo	0,048
2017	negativo	0,050
2018	negativo	0,061
2023	negativo	0,056
2024	negativo	0,051
2028	negativo	0,102
2033	negativo	0,050
2034	negativo	0,077
2043	negativo	0,045

ES 2 194 782 T3

5	3123	negativo	0,055
	3213	negativo	0,119
	3214	negativo	0,062
10	3224	negativo	0,048
	3225	negativo	0,065
	3236	negativo	0,043
15	4004	negativo	0,089
	5004	negativo	0,079
	5007	negativo	0,055
20	5008	negativo	0,156
	5009	negativo	0,076
	5010	negativo	0,073
25	5012	negativo	0,051
	5013	negativo	0,057
	5017	negativo	0,064
30	5018	negativo	0,033
	5019	negativo	0,017
35	5020	negativo	0,017
	5021	negativo	0,019
	5022	negativo	0,020
40	5024	negativo	0,015
	5025	negativo	0,017
	5027	negativo	0,022
45	5028	negativo	0,021
	5030	negativo	0,019
50	5031	negativo	0,014
	5033	negativo	0,018
	5034	negativo	0,013
55	5035	negativo	0,018
	5036	negativo	0,031
60	5040	negativo	0,024

5042	negativo	0,026
5046	negativo	0,021
5052	negativo	0,020
5056	negativo	0,523
5057	negativo	0,023
5060	negativo	0,055
5063	negativo	0,022
5064	negativo	0,017
5065	negativo	0,035
5066	negativo	0,024
5067	negativo	0,088
5068	negativo	0,021
6002	negativo	0,078
6005	negativo	0,019
6008	negativo	0,013
6019	negativo	0,034
7005	negativo	0,025
7006	negativo	4,556
7009	negativo	0,030
7013	negativo	0,024
8004	negativo	0,023
8047	negativo	0,021
213	positivo	0,879
294	positivo	4,097
444-1	positivo	0,201
1003	positivo	0,475
1013	positivo	4,087
1014	positivo	0,105
1015	positivo	2,469
1028	positivo	0,096
1029	positivo	4,466

ES 2 194 782 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

1037	positive	2,485
2001	positive	0,083
2003	positive	0,817
2005	positive	1,508
2008	positive	4,247
2009	positive	1,597
2016	positive	2,651
2022	positive	0,135
2029	positive	3,953
2032	positive	3,400
2035	positive	3,384
2039	positive	0,053
2040	positive	4,602
2041	positive	0,200
2042	positive	4,592
3146	positive	1,742
6014	positive	2,572
3149	positive	0,989
3153	positive	4,590
3570	positive	4,567
3577	positive	4,566
3215	positive	4,540
3219	positive	4,486
3220	positive	4,518
3231	positive	4,706
3234	positive	4,567
3235	positive	4,616
3241	positive	3,671
3243	positive	4,582
4003	positive	4,700
4005	positive	0,401

4006	positive	4,694
4018	positive	4,142
4019	positive	2,366
4020	positive	1,468
5001	positive	4,490
5002	positive	3,917
5003	positive	4,321
5006	positive	4,826
77	positive	0,067
5011	positive	0,071
53	positive	4,773
70	positive	1,084
5016	positive	0,101
68	positive	4,611
67	positive	0,589
5029	positive	0,675
64	positive	1,785
58	positive	0,304
5039	positive	3,391
CXT 13	positive	3,785
6013	positive	1,972
CXT 12	positive	0,157
5048	positive	1,695
5050	positive	0,490
CXT 10	positive	0,247
5053	positive	4,232
5055	positive	4,364
CXT 9	positive	2,455
5058	positive	3,886
5059	positive	4,450
CXT 8	positive	4,374

5	5061	positivo	4,032
	CXT 7	positivo	0,647
	5069	positivo	1,079
10	CXT 5	positivo	0,602
	5072	positivo	4,151
	5075	positivo	4,307
15	5076	positivo	4,516
	CXT 4	positivo	0,268
	5078	positivo	1,022
20	6001	positivo	4,441
	6004	positivo	4,296
	CXT 3	positivo	2,126
25	6018	positivo	4,656
	6020	positivo	0,427
	7001	positivo	2,717
30	CXT 2	positivo	4,479
	7002	positivo	4,143
35	7003	positivo	0,149
	7004	positivo	4,543
	CXT 1	positivo	0,953
40	8026	positivo	0,025
	8033	positivo	0,784

CXT 6	positivo	4,592
-------	----------	-------

45

ELISA del *H. pylori* (n = 182)

50			Estado infección <i>H. pylori</i>	
			positivo	negativo
55	Ensayo ELISA sandwich de heces con <i>H. pylori</i> corte OD ₄₅₀₋₆₂₀ : 0,09 sensibilidad: 94,7% especificidad: 93,2%	positivo	89	6
60		negativo	5	82

ES 2 194 782 T3

Resultado

En la tabla 4 se recogen los resultados del estudio de muestras de heces negativas en *H. pylori* y positivas en *H. pylori* mediante un ensayo ELISA sandwich. Para ello se emplean anticuerpos monoclonales, con preferencia anticuerpos monoclonales HP25.2m/2H10 tanto como anticuerpos capturadores como detectores (marcados con PDO) para detectar el antígeno de *H. pylori*, la catalasa, en muestras de heces. La catalasa es un antígeno extraordinariamente estable que pasa prácticamente inalterado por el tracto digestivo y, por tanto, puede detectarse en la muestra de excrementos. El análisis de 182 muestras de heces en un sistema ELISA exclusivamente monoclonal, basado en un solo un mAk específico de la catalasa, presenta una sensibilidad del 94,7% y una especificidad del 93,2%. Esta sensibilidad y especificidad conducen a valores predictivos positivos y negativos tan elevados, que puede constatar una infección con *H. pylori* realizando un solo análisis de heces, sencillo, económico y no invasivo, con una seguridad suficiente para decidir el tratamiento de erradicación. Se puede lograr un aumento de la sensibilidad y especificidad posiblemente combinando dos sistemas de detección para diversos antígenos (p.ej. catalasa/ureasa).

Con el desarrollo de un ensayo ELISA de una sola etapa se logró una mayor comodidad para el usuario frente al ensayo ELISA de tres etapas, descrito a continuación (ejemplos 11 y 12).

Ejemplo 11

Determinación de pares de anticuerpos idóneos para el ELISA de tres etapas

El ensayo se ejecutó con arreglo al ejemplo 10.

Para determinar los pares de anticuerpos idóneos se disponía de anticuerpos monoclonales contra la catalasa (ver tabla 3), purificados y parcialmente biotinilados (ver ejemplo 7). Los anticuerpos se valoran primeramente entre sí para determinar la concentración óptima del anticuerpo capturador y detector. A continuación se analizan las muestras de heces con los sistemas ELISA optimizados de este modo y se determinan los límites de detección de catalasa en heces humanas negativas en *H. pylori* (heces en blanco) (tabla 5).

En la tabla 5 se recogen las combinaciones idóneas de mAk para el reconocimiento del paciente y para los límites de detección del antígeno.

TABLA 5

Resultados de la búsqueda de pares de anticuerpos monoclonales contra la catalasa (ELISA de tres etapas)					
Anticuerpos detectores biotinilados	Anticuerpos capturadores				
	25.2m/2H10	25.6m/ 1B5	25.6m/ 1G4	25.6m/ 1A5	25.6m/ 1H4
25.2m/2H10	N: 0,03 G4: 7-8 G0: 2	0,1 7 2	0,03 8 2	0,1 7 2	0,03 8 2
25.6m/1B5	N: 0,1 G4: 8 G0: 2	0,1 7 1	0,1 5 2	0,03 7 2	0,3 8 2
25.6m/1G4	N: 0,3 G4: 6-8 G0: 1-2	0,1 7 2	0,1 8 4	0,01 8 2	0,1 8 2
25.6m/1A5	N: 0,3 G4: 6-7 G0: 2	0,1 7 2	0,3 5 2	0,1 2	0,3 7 8 2
25.6m/1H4	N: 0,1 G4: 8 G0: 3	0,3	0,1	0,3	0,1 4-7 7 8 2 2 2
Reconocimiento del paciente (detección de 8 muestras G4 positivas críticas y 4 muestras G0 clínicamente negativas) N= límites de detección (ng/ml) de la catalasa en las heces en blanco positivas críticas = muestras de detección especialmente problemática.					

ES 2 194 782 T3

Determinación de pares de anticuerpos idóneos para el ELISA de una sola etapa

Para determinar los pares de anticuerpos idóneos se disponía de anticuerpos monoclonales contra la catalasa (ver tabla 3) en estado purificado y en parte marcados con peroxidasa (ver ejemplo 7).

5

Se ensayaron diversas combinaciones de anticuerpos capturadores y detectores (ver tabla 6) en el ELISA de una sola etapa con muestras de 27 pacientes positivos en *H. pylori* y 17 negativos en *H. pylori*.

Ensayo ELISA sandwich de una sola etapa

10

El recubrimiento de la placa ELISA (MaxiSorb Lockwell; Nunc) se realizó durante una noche a 2-8°C con 100 µl de una solución de mAK (2,0 µg de anticuerpos capturadores/ml de tampón carbonato 0,1 M, pH 9,5). Las placas ELISA recubiertas de este modo se lavaron 2 veces con PBS y para bloquear los sitios de unión todavía libres se introdujeron en cada hoyo 200 µl de tampón de bloqueo (BSA del 0,3%; sorbita al 20% en PBS) y se incubó a 2-8°C durante una noche. Se secaron estas placas ELISA con vacío, se secaron en estufa de aire forzado a 28°C durante una noche y después se almacenaron con una bolsa de desecante a 2-8°C.

15

Se suspendieron los excrementos de los pacientes en proporción 1:5 (0,1 g de muestra de heces + 500 µl de tampón de muestra) en tampón de muestra (PBS 150 mM + 0,5% de suero animal + EDTA 1 mM + 0,1% de detergente) durante 30 s (Vortex) y después se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Se aplicaron a cada hoyo de la placa 50 µl del sobrenadante.

20

A continuación se añadieron directamente a la suspensión de heces 50 µl del anticuerpo marcado con POD y diluido con tampón de muestra (0,5 nM de AK-dextrano-POD o bien 0,2 µg/ml de HP25.2m/2H10-POD-P). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en el agitador.

25

Después de cinco lavados con tampón de lavado (PBS 75 mM, 0,25% de Tween) se añadió el sustrato de peroxidasa TMB (tetrametilbencidina), el sustrato monocomponente (Neogen), (100 µl/hoyo). Pasados 10 minutos se interrumpió la reacción enzimática por adición de ácido clorhídrico 1 N (100 µl/hoyo). La posterior medición de la intensidad de calor se realizó a 450 nm frente a la longitud de onda de referencia de 630 nm.

30

35

40

45

(Ver Tabla 6 en la página siguiente)

50

55

60

TABLA 6

Resultados de la búsqueda de pares de anticuerpos monoclonales contra la catalasa (ELISA monoetapa)									
Anticuerpo detector marcado con POD	Anticuerpo capturador								
	25.2m/2H10	25.6m/1B5	25.6m/1A5	25.6m/4A12	25.6m/1G4	25.6m/1H4	25.6m/3D6	25.6m/2E12	25.6m/5E4
25.2m/2H10	-	24	24	22	23	24	19	24	22
		14	11	13	14	12	14	12	15
25.6m/1B5	G4: 23	-	23	20	23	23	18	23	22
	G0: 12		13	14	12	12	12	10	12
25.6m/1H4	G4: 21	24	24	-	24	-	20	25	24
	G0: 9	13	14		11		15	12	20
25.6m/4A12	G4: 20	20	20	-	20	25	19	20	20
Anticuerpo detector marcado con POD	25.2m/2H10	25.6m/1B5	25.6m/1A5	25.6m/4A12	25.6m/1G4	25.6m/1H4	25.6m/3D6	25.6m/2E12	25.6m/5E4
	G0: 13	12	17		13	3	13	13	15
25.6m/3D6	G4: 17	24	24	21	23	23	-	22	22
	G0: 15	9	12	13	8	13		9	14
Reconocimiento de paciente (detección de 27 muestras G4 positivas críticas y 17 muestras G0 clínicamente negativas; corte OD ₄₅₀₋₆₃₀ : 0,15									

La combinación de anticuerpos HP25.6m/1B5 (anticuerpo capturador) y HP25.2m/2H10-POD (anticuerpo detector) resultó ser la más ventajosa para la detección de antígenos de *H. pylori* (catalasa) en las heces humanas debido al buen reconocimiento del paciente (detección correcta de 24 de las 27 muestras positivas en *H. pylori* y 14 de las 17 muestras negativas en *H. pylori*).

Ejemplo 12

Detección de *H. pylori* en heces humanas mediante ELISA de una sola etapa

Para el ensayo se disponía de muestras de heces de pacientes procedentes de diez clínicas distintas o de consultorios médicos gastroenterológicos, cuyo estado de infección, positivo o negativo en *H. pylori*, se había determinado por ensayo respiratorio de urea-C¹³ y/o análisis histológicos de biopsias gástricas.

Ensayo ELISA sandwich (de una sola etapa) de heces con *H.pylori*

El recubrimiento de la placa ELISA (MaxiSorb Lockwell; Nunc) se realizó durante una noche a 2-8°C con 100 µl de una solución de mAK (2,0 µg de HP25.6m/1B5 / ml de tampón carbonato 0,1 M, pH 9,5). Las placas ELISA recubiertas de este modo se lavaron 2 veces con PBS y para bloquear los sitios de unión todavía libres se introdujeron en cada hoyo 200 µl de tampón de bloqueo (BSA del 0,3%; sorbita al 20% en PBS) y se incubó a 2-8°C durante una noche. Se secaron estas placas ELISA con vacío, se secaron en estufa de aire forzado a 28°C durante una noche y después se almacenaron con una bolsa de desecante a 2-8°C.

Se suspendieron los excrementos de los pacientes en proporción 1:5 (0,1 g de muestra de heces + 500 µl de tampón de muestra) en tampón de muestra (PBS 150 mM + 0,5% de suero animal + EDTA 1 mM + 0,1% de detergente) durante 30 s (Vortex) y después se centrifugaron a 3000 rpm durante 5

ES 2 194 782 T3

min. Se aplicaron a cada hoyo de la placa 50 μ l del sobrenadante (determinación por duplicado o por triplicado). A continuación se añadieron directamente a la suspensión de heces 50 μ l del anticuerpo HP25.2m/2H10-dextrano-POD, marcado con POD y diluido con tampón de muestras. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en el agitador.

5

Después de cinco lavados con tampón de lavado (PBS 75 mM, 0,25 % de Tween) se añadió el sustrato de peroxidasa TMB (tetrametilbencidina), el sustrato monocomponente (Neogen), (100 μ l/hoyo). Pasados 10 minutos se interrumpió la reacción enzimática por adición de ácido clorhídrico 1 N (100 μ l/hoyo). La posterior medición de la intensidad de calor se realizó a 450 nm frente a la longitud de onda de referencia de 630 nm.

10

TABLA 7

Cotejo de los resultados experimentales del ensayo ELISA monoetapa y del patrón oro en el análisis de un total de 199 muestras de heces

15

Nº de muestra	Resultado de ensayo respiratorio C13	Resultado ELISA monoetapa	
1001	n.d.	negativo	0.033
1002	n.d.	negativo	0.022
1007	n.d.	negativo	0.015
1008	n.d.	negativo	0.032
1010	n.d.	negativo	0.016
1012	n.d.	negativo	0.026
1017	n.d.	negativo	0.026
1021	n.d.	negativo	0.014
1022	n.d.	negativo	0.018
1024	n.d.	negativo	0.018
1025	n.d.	negativo	0.022
1027	n.d.	negativo	0.044
1030	n.d.	negativo	0.021
1031	n.d.	negativo	0.014
1032	n.d.	negativo	0.014
1034	n.d.	negativo	0.023
1035	n.d.	negativo	0.068
1040	n.d.	negativo	0.058
1046	n.d.	negativo	0.023
2002	n.d.	negativo	0.019
2006	n.d.	negativo	0.017
2007	negativo	n.d.	0.019
2010	n.d.	negativo	0.070
2012	negativo	n.d.	0.040
2013	negativo	n.d.	0.040

20

25

30

35

40

45

50

55

60

2014	negativo	n.d.	0.016
2015	n.d.	negativo	0.027
2017	negativo	negativo	0.034
2018	negativo	negativo	0.030
2023	n.d.	negativo	0.031
2024	negativo	n.d.	0.023
2028	n.d.	negativo	0.049
2033	negativo	negativo	0.040
2034	negativo	negativo	0.083
2043	n.d.	negativo	0.083
3123	negativo	n.d.	0.013
3213	n.d.	negativo	0.035
3224	negativo	n.d.	0.014
3225	n.d.	negativo	0.025
4004	n.d.	negativo	0.044
5004	n.d.	negativo	0.045
5007	n.d.	negativo	0.014
5008	n.d.	negativo	0.015
5009	n.d.	negativo	0.028
5010	n.d.	negativo	0.058
5012	n.d.	negativo	0.030
5013	n.d.	negativo	0.031
5017	n.d.	negativo	0.027
5018	n.d.	negativo	0.033
5019	n.d.	negativo	0.010
5020	n.d.	negativo	0.192
5021	n.d.	negativo	0.023
5022	n.d.	negativo	0.017

ES 2 194 782 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

5024	n.d.	negative	0.011
5025	n.d.	negative	0.015
5027	n.d.	negative	0.026
5028	n.d.	negative	0.020
5030	n.d.	negative	0.033
5031	n.d.	negative	0.013
5033	n.d.	negative	0.014
5035	n.d.	negative	0.028
5036	n.d.	negative	0.022
5040	n.d.	negative	0.024
5042	n.d.	negative	0.053
5046	n.d.	negative	0.018
5052	n.d.	negative	0.015
5056	n.d.	negative	1.919
5057	n.d.	negative	0.015
5060	n.d.	negative	0.027
5063	n.d.	negative	0.010
5064	n.d.	negative	0.010
5066	n.d.	negative	0.020
5067	n.d.	negative	0.041
5068	n.d.	negative	0.017
6002	n.d.	negative	0.024
6005	n.d.	negative	0.023
6008	n.d.	negative	0.054
6009	n.d.	negative	0.065
6017	n.d.	negative	0.024
6024	n.d.	negative	0.050
6026	n.d.	negative	0.017
6029	n.d.	negative	0.014
6033	n.d.	negative	0.013
6038	n.d.	negative	0.019

6039	n.d.	negative	0.015
7005	n.d.	negative	0.031
7009	n.d.	negative	0.039
7013	n.d.	negative	0.026
8004	n.d.	negative	0.015
8047	n.d.	negative	0.042
9004	n.d.	negative	0.012
9005	n.d.	negative	0.105
9010	n.d.	negative	0.054
9011	n.d.	negative	0.647
9012	n.d.	negative	0.026
9013	n.d.	negative	0.022
9015	n.d.	negative	0.032
9019	n.d.	negative	0.040
9022	n.d.	negative	0.029
213	n.d.	positive	0.752
444	n.d.	positive	0.241
1003	n.d.	positive	0.446
1013	n.d.	positive	3.809
1014	n.d.	positive	0.316
1015	n.d.	positive	2.693
1028	n.d.	positive	0.959
1029	n.d.	positive	4.336
1037	n.d.	positive	2.152
2005	positive	n.d.	1.289
2008	n.d.	positive	3.814
2009	positive	n.d.	1.050
2016	n.d.	positive	1.564
2029	positive	positive	4.347
2032	positive	positive	2.661
2035	n.d.	positive	3.632

ES 2 194 782 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

2039	positive	positive	0,694
2040	n.d.	positive	3.189
2041	positive	positive	1.195
2042	positive	positive	4.350
3146	positive	n.d.	4.189
3219	positive	positive	4.267
3220	positive	positive	4.138
3231	positive	positive	4.332
3234	positive	positive	3.989
3241	positive	positive	1.580
3570	positive	n.d.	4.147
4003	n.d.	positive	4.140
4005	positive	positive	0.298
4006	n.d.	positive	4.228
4018	n.d.	positive	3.319
4019	n.d.	positive	2.892
4020	n.d.	positive	1.167
5001	n.d.	positive	4.438
5006	n.d.	positive	4.343
5029	n.d.	positive	1.354
5039	n.d.	positive	4.401
5048	n.d.	positive	2.805
5050	n.d.	positive	0.744
5053	n.d.	positive	3.896
5055	n.d.	positive	3.825
5058	n.d.	positive	4.153
5061	n.d.	positive	4.050
5069	n.d.	positive	1.411
5072	n.d.	positive	4.322
5075	n.d.	positive	4.285
5076	n.d.	positive	4.402

5078	n.d.	positive	1.319
5090	n.d.	positive	4.268
5092	n.d.	positive	1.975
5100	n.d.	positive	2.406
5150	n.d.	positive	0.132
6001	n.d.	positive	4.325
6004	n.d.	positive	4.035
6013	n.d.	positive	2.684
6014	n.d.	positive	4.209
6015	n.d.	positive	4.164
6018	n.d.	positive	4.551
6020	n.d.	positive	0.376
6022	n.d.	positive	1.915
6027	n.d.	positive	4.244
6040	n.d.	positive	3.105
6050	n.d.	positive	3.806
6052	n.d.	positive	4.221
6064	n.d.	positive	4.225
6065	n.d.	positive	4.210
7001	n.d.	positive	2.584
7002	n.d.	positive	4.245
7003	n.d.	positive	2.236
7020	n.d.	positive	0.038
8026	n.d.	positive	0.013
8033	n.d.	positive	1.269
9001	n.d.	positive	3.765
9002	n.d.	positive	4.049
9003	n.d.	positive	3.674
9006	n.d.	positive	0.992
9007	n.d.	positive	0.052
9008	n.d.	positive	4.165

ES 2 194 782 T3

5	9009	n.d.	positivo	0.033
	9014	n.d.	positivo	4.042
	9017	n.d.	positivo	4.276
10	9018	n.d.	positivo	0,44
	9022	n.d.	positivo	1.961
	T 01	positivo	n.d.	2.083
15	T 02	positivo	n.d.	1.722
	T 03	positivo	positivo	3.871
	T 04	positivo	positivo	4.463
20	T 05	positivo	positivo	2.368
	T 07	positivo	positivo	0.785

T 09	positivo	n.d.	1.480
T 10	positivo	n.d.	0.768
T 13	n.d.	positivo	2.211
T 53	positivo	n.d.	4.500
T 58	positivo	n.d.	1.540
T 64	positivo	n.d.	1.879
T 67	positivo	n.d.	1.608
T 68	positivo	n.d.	4.377
T 70	positivo	n.d.	0.675
T 77	positivo	n.d.	0.038
T 88	positivo	n.d.	1.377

n.d. = no determinado

corte: (OD 450-630 nm): positivo $\geq 0,18$; negativo $\leq 0,13$

30 (n = 199)

Método

35			estándar oro	
			positivo	negativo
40	Ensayo monoetapa	positivo	94	3
	sensibilidad: 94 % especificidad: 97 %	negativo	6	96

45

50

55

60

Resultado

En la tabla 7 se presentan los resultados de los análisis de muestras de heces negativas y positivas en *H. pylori* mediante un ensayo ELISA sandwich de una sola etapa. Para la detección del antígeno catalasa de *H. pylori* en la muestra de heces se utilizaron los anticuerpos monoclonales (HP25.6m/1B5; HP25.2m/2H10). El análisis de 199 muestras de heces con un sistema ELISA exclusivamente monoclonal, basado en el mAK específico de la catalasa recién mencionada, tiene una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 97 %.

10 Ejemplo 13

Detección de H. pylori en heces humanas mediante un ensayo ELISA monoetapa optimizado

Para este ensayo se disponía de 357 muestras de heces de pacientes procedentes de diez clínicas o consultorios médicos gastroenterológicos distintos, cuyo estado de infección de *H. pylori* se había determinado por estudios histológicos de biopsias gástricas. La ejecución del ensayo se realizó de forma opaca (las muestras se codificaron para que el personal del laboratorio no pudiera saber de antemano el estado de infección de las muestras) en un laboratorio GLP (= que cumple las normas Good Laboratory Practices) externo.

20 *Ensayo ELISA sandwich monoetapa optimizado*

El recubrimiento de la placa ELISA (MaxiSorb Lockwell; Nunc) se realizó durante una noche a 2-8°C con 100 µl de una solución de mAK (2,0 µg de HP25.6m/1B5 / ml de tampón carbonato 0,1 M, pH 9,5). Las placas ELISA recubiertas de este modo se lavaron 2 veces con PBS y para bloquear los sitios de unión todavía libres se introdujeron en cada hoyo 200 µl de tampón de bloqueo (BSA del 0,3 %; sorbita al 5 % en PBS) y se incubó a 2-8°C durante una noche. Se secaron estas placas ELISA con vacío, se secaron en estufa de aire forzado a 28°C durante una noche y después se almacenaron con una bolsa de desecante a 2-8°C.

Se suspendieron los excrementos de los pacientes en proporción 1:5 (0,1 g de muestra de heces + 500 µl de tampón de muestra) en tampón de muestra (PBS 150 mM + 0,5 % de suero animal + EDTA 1 mM + 0,1 % de detergente) durante 30 s (Vortex) y después se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Se aplicaron a cada hoyo de la placa 50 µl del sobrenadante. A continuación se añadieron directamente a la suspensión de heces 50 µl del anticuerpo marcado con POD y diluido con tampón de muestras (200 femtomol / ml de HP25.2m/2H10-dextrano-marcado con POD). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en el agitador. Después de cinco lavados con tampón de lavado (PBS 75 mM, 0,25 % de Tween) se añadió el sustrato de peroxidasa TMB (tetrametilbencidina), el sustrato monocomponente (Seramun), (100 µl/hoyo). Pasados 10 minutos se interrumpió la reacción enzimática por adición de ácido sulfúrico 1 M (100 µl/hoyo). La posterior medición de la intensidad de calor se realizó a 450 nm frente a la longitud de onda de referencia de 630 nm.

45

50

(Ver Tabla 8 en las páginas siguientes)

55

60

TABLA 8

*ELISA sandwich (monoetapa optimizado) de heces con H. pylori**Detección de catalasa de H. pylori en heces con ELISA monoetapa optimizado, empleando anticuerpos monoclonales HP25.6m/1B5; HP25.2m/2H10*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Paciente Nº	Resultado histológico	ELISA heces HP
CX 7042	negativo	0,022
CX 12070	negativo	0,018
CX 9138	negativo	0,013
CX 12080	negativo	0,015
CX 12076	negativo	0,071
CX 7028	negativo	0,019
CX 9046	negativo	0,013
CX 12077	negativo	0,025
CX 9109	negativo	0,012
CX 9120	negativo	0,018
CX 9144	negativo	0,014
CX 12032	negativo	0,017
CX 2067	negativo	0,037
CX 8010	negativo	0,017
CX 12027	negativo	0,043
CX 12085	negativo	0,012
CX 2105	negativo	0,016
CX 9029	negativo	0,028
CX 9101	negativo	0,013
CX 9119	negativo	0,073
CX 9129	negativo	0,022

CX 9174	negativo	0,029
CX 12079	negativo	0,016
CX 12092	negativo	0,031
CX 2066	negativo	0,043
CX 5115	negativo	0,022
CX 7035	negativo	0,076
CX 9024	negativo	0,018
CX 9136	negativo	0,014
CX 12065	negativo	0,017
CX 12084	negativo	0,014
CX 2044	negativo	0,028
CX 7032	negativo	0,048
CX 8011	negativo	0,014
CX 8050	negativo	0,015
CX 9056	negativo	0,014
CX 6067	negativo	0,016
CX 9041	negativo	0,036
CX 9157	negativo	0,021
CX 12042	negativo	0,014
CX 9134	negativo	0,016
CX 9160	negativo	0,015
CX 9171	negativo	0,042
CX 9025	negativo	0,017
CX 9150	negativo	0,014

ES 2 194 782 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

CX 2050	negative	0,013
CX 2057	negative	0,021
CX 9184	negative	0,018
CX 11021	negative	0,009
CX 7043	negative	0,024
CX 7036	negative	0,016
CX 7047	negative	0,015
CX 9064	negative	0,06
CX 8002	negative	0,015
CX 9115	negative	0,016
CX 9189	negative	0,063
CX 9195	negative	0,015
CX 12059	negative	0,028
CX 8015	negative	0,015
CX 9137	negative	0,052
CX 9187	negative	0,015
CX 9047	negative	0,017
CX 9166	negative	0,019
CX 12064	negative	0,031
CX 2070	negative	0,018
CX 6081	negative	0,05
CX 9104	negative	0,013
CX 9167	negative	0,017
CX 9196	negative	0,027
CX 9066	negative	0,016
CX 10010	negative	0,012
CX 9061	negative	0,014
CX 9170	negative	0,013
CX 11012	negative	0,03
CX 2064	negative	0,024
CX 5101	negative	0,025

CX 7021	negative	0,045
CX 9105	negative	0,013
CX 12016	negative	0,019
CX 6070	negative	0,013
CX 2101	negative	0,021
CX 8014	negative	0,016
CX 9169	negative	0,014
CX 12088	negative	0,017
CX 9121	negative	0,033
CX 9023	negative	0,055
CX 12071	negative	0,022
CX 10003	negative	0,028
CX 12047	negative	0,02
CX 9089	negative	0,017
CX 9107	negative	0,032
CX 2061	negative	0,03
CX 11013	negative	0,014
CX 9092	negative	0,017
CX 12021	negative	0,049
CX 12024	negative	0,023
CX 9125	negative	0,019
CX 2107	negative	0,025
CX 9039	negative	0,032
CX 12046	negative	0,013
CX 11024	negative	0,053
CX 12012	negative	0,015
CX 12040	negative	0,028
CX 2087	negative	0,027
CX 9028	negative	0,018
CX 9176	negative	0,014
CX 10007	negative	0,019

ES 2 194 782 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

CX 12089	negative	0,012
CX 7048	negative	0,041
CX 9114	negative	0,019
CX 12019	negative	0,028
CX 7033	negative	0,081
CX 9067	negative	0,016
Cx 9108	negative	0,165
CX 9197	negative	0,016
CX 5133	negative	0,219
CX 9094	negative	0,041
CX 10021	negative	0,019
CX 12090	negative	0,012
CX 9116	negative	0,018
CX 10037	negative	0,019
CX 12049	negative	0,016
CX 12093	negative	0,026
CX 9097	negative	0,02
CX 9183	negative	0,025
CX 11023	negative	0,088
CX 5114	negative	0,061
CX 9161	negative	0,017
CX 2068	negative	0,027
CX,8005	negative	0,025
CX 9179	negative	0,015
CX 12001	negative	0,028
CX 9062	negative	0,022
CX 9118	negative	0,013
CX 6071	negative	0,027
CX 9035	negative	0,016
CX 10006	negative	0,017
CX 9095	negative	0,018

CX 9199	negative	0,016
CX 10018	negative	0,019
CX 12008	negative	0,018
CX 9052	negative	0,015
CX 9181	negative	0,014
CX 12058	negative	0,055
CX 9030	negative	0,023
CX 9059	negative	0,015
CX 10005	negative	0,028
CX 10039	negative	0,018
CX 9190	negative	0,015
CX 9164	negative	0,016
CX 10044	negative	0,023
CX 9110	negative	0,027
CX 9127	negative	0,018
CX 12013	negative	0,022
CX 5105	negative	0,017
CX 9178	negative	0,037
CX 10024	negative	0,015
CX 2098	negative	0,038
CX 10008	negative	0,015
CX 10034	negative	0,016
CX 9162	negative	0,513
CX 12023	negative	0,023
CX 2091	negative	0,225
CX 12034	negative	0,022
CX 12039	negative	0,019
CX 9085	negative	0,022
CX 10029	negative	0,03
CX 11022	negative	0,031
CX 2073	negative	0,035

ES 2 194 782 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

CX 12017	negative	0,017
CX 9141	negative	0,024
CX 10026	negative	0,014
CX 12003	negative	0,038
CX 7049	negative	0,028
CX 9026	negative	0,026
CX 10011	negative	0,012
CX 9124	negative	0,02
CX 12015	negative	0,029
CX 10022	negative	0,021
CX 10001	negative	0,017
CX 7040	negative	0,014
CX 9048	negative	0,017
CX 6075	negative	0,024
CX 10016	negative	0,024
CX 9073	negative	0,015
CX 9081	negative	0,036
CX 12007	negative	0,034
CX 9122	negative	0,078
CX 9069	negative	0,025
CX 9091	negative	0,029
CX 10012	negative	0,034
CX 10027	negative	0,07
CX 10009	negative	0,023
CX 10014	negative	0,021
CX 9040	negative	0,038
CX 9090	negative	0,027
CX 12006	negative	0,026
CX 9060	negative	0,013
CX 10031	negative	0,023
CX 9075	negative	0,019

CX 5131	negative	0,032
CX 9054	negative	0,016
CX 9070	negative	0,022
CX 12099	negative	0,014
CX 9050	negative	0,038
CX 9086	negative	0,017
CX 10013	negative	0,036
CX 12062	negative	4
CX 6063	negative	3,537
CX 9133	positive	0,023
CX 9188	positive	0,017
CX 9192	positive	0,014
CX 2048	positive	0,548
CX 2078	positive	0,296
CX 8009	positive	0,695
CX 9145	positive	1,778
CX 9076	positive	0,09
CX 9072	positive	0,024
CX 5148	positive	0,213
CX 11004	positive	0,477
CX 2093	positive	0,271
CX 12060	positive	1,205
CX 7053	positive	2,436
CX 11006	positive	0,13
CX 8001	positive	4
CX 2100	positive	1,539
CX 5113	positive	0,583
CX 7029	positive	0,155
CX 10020	positive	1,335
CX 2099	positive	3,403
CX 12018	positive	0,927

ES 2 194 782 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

CX 7037	positive	4
CX 2083	positive	3,896
CX 4001	positive	0,678
CX 5125	positive	4
CX 9049	positive	0,588
CX 5112	positive	1,797
CX 9142	positive	3,122
CX 7044	positive	2,155
CX 2109	positive	3,786
CX 8012	positive	4
CX 4011	positive	3,376
CX 10049	positive	2,98
CX 5128	positive	3,348
CX 10038	positive	3,652
CX 12067	positive	2,928
CX 4029	positive	3,087
CX 2104	positive	2,855
CX 11003	positive	0,786
CX 9065	positive	1,324
CX 12048	positive	2,409
CX 12051	positive	4
CX 10015	positive	4
CX 7024	positive	4
CX 12091	positive	4
CX 5126	positive	3,834
CX 7057	positive	4
CX 5120	positive	1,935
CX 11002	positive	0,378
CX 11011	positive	4
CX 2102	positive	2,452
CX 2103	positive	3,091

CX 11010	positive	1,905
CX 5108	positive	3,58
CX 9130	positive	2,499
CX 11008	positive	3,367
CX 9194	positive	4
CX 12028	positive	3,671
CX 4016	positive	2,545
CX 4013	positive	4
CX 9135	positive	4
CX 11001	positive	4
CX 2106	positive	2,71
CX 2094	positive	4
CX 9082	positive	1,769
CX 5123	positive	3,773
CX 6076	positive	4
CX 9155	positive	4
CX 7030	positive	3,661
CX 9128	positive	4
CX 12035	positive	4
CX 10023	positive	3,426
CX 2060	positive	4
CX 12041	positive	4
CX 9045	positive	1,382
CX 9096	positive	1,653
CX 2056	positive	4
CX 12002	positive	2,441
CX 6061	positive	0,018
CX 11020	positive	4
CX 9147	positive	3,758
CX 9078	positive	3,686
CX 5147	positive	4

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

CX 7023	positivo	4
CX 9131	positivo	4
CX 9156	positivo	4
CX 10019	positivo	3,438
CX 12026	positivo	3,941
CX 9079	positivo	3,628
CX 4023	positivo	4
CX 9031	positivo	3,273
CX 5116	positivo	4
CX 9077	positivo	3,929
CX 4012	positivo	4
CX 5106	positivo	3,648
CX 12095	positivo	4
CX 10002	positivo	3,698
CX 11005	positivo	4
CX 9093	positivo	4
CX 11014	positivo	3,465
CX 9051	positivo	4
CX 10028	positivo	3,799
CX 4017	positivo	4
CX 9182	positivo	4

CX 12074	positivo	4
CX 9055	positivo	4
CX 9036	positivo	4
CX 6078	positivo	4
CX 2069	positivo	3,778
CX 9043	positivo	3,727
CX 12050	positivo	3,516
CX 5119	positivo	4
CX 9113	positivo	4
CX 9068	positivo	3,857
CX 2092	positivo	4
CX 10050	positivo	4
CX 9053	positivo	3,874
CX 4015	positivo	3,784
CX 12075	positivo	3,717
CX 9027	positivo	3,718
CX 9080	positivo	4
CX 9098	positivo	4
CX 9112	positivo	4
CX 9175	positivo	4
CX 9063	positivo	4

5	CX 9099	positivo	4
	CX 12022	positivo	4
	CX 2079	positivo	3,884
10	CX 9102	positivo	3,524
	CX 2076	positivo	3,593
	Cx 9177	positivo	4
15	CX 9088	positivo	2,14
	CX 6072	positivo	4
20	CX 7038	positivo	4
	CX 9123	positivo	4
25	CX 9149	positivo	4

CX 12020	positivo	4
CX 9158	positivo	4
CX 9198	positivo	3,874
CX 9165	positivo	4
CX 9034	positivo	3,874
CX 12055	positivo	3,754
CX 6074	positivo	4
CX 6082	positivo	4
CX 6069	positivo	4
CX 9193	positivo	4
CX 9106	positivo	4

corte: OD₄₅₀₋₄₆₀: 0,15

n = 357

30			Histología	
			positivo	negativo
35	ELISA heces HP	positivo	141	6
		negativo	7	203

40 sensibilidad: 95%; intervalo de confianza (95%): 90,5-98,1%

especificidad: 97%; intervalo de confianza (95%): 93,9-98,0%

45 *Resultado*

En la tabla 8 se recogen los resultados de análisis de muestras de heces negativas y positivas en *H. pylori* (primer diagnóstico) mediante un ensayo ELISA sandwich. Para la detección del antígeno catalasa de *H. pylori* en la muestra de heces se utilizaron los anticuerpos monoclonales (anticuerpo captador: HP25.6m/1B5; anticuerpo detector: HP25.2m/2H10-POD). El análisis de las muestras de heces con un sistema ELISA exclusivamente monoclonal, basado en el mAk específico de la catalasa recién mencionada, tiene una sensibilidad del 95% y una especificidad del 97%.

Ejemplo 14

55 *Curso de erradicación / control de erradicación*

El control de erradicación solo es posible a través de la detección directa de antígenos de *H. pylori* y no de anticuerpos en el suero, ya que los anticuerpos de *H. pylori* siguen estando presentes en la sangre incluso durante muchos meses después de la infección. Por lo tanto y a diferencia del ensayo serológico del *H. pylori*, el ensayo ELISA sandwich de las heces brinda la posibilidad de evaluar con éxito una erradicación.

En la figura 9 se presenta el curso de un tratamiento de erradicación de un paciente positivo en *H. pylori* después de la ingestión de omeprazol, metronidazol y claritromicina. 6 días después del tratamiento no se detecta ya ningún antígeno de *H. pylori* en las heces.

5 En la tabla 9 se presentan los resultados del ensayo ELISA de heces de HP en un estudio de erradicación. Las muestras de heces se recogieron de 4 a 6 semanas después de finalizada la terapia de erradicación. Como ensayo de referencia se empleó el ensayo respiratorio C¹³. La ejecución del ensayo se realizó con arreglo al ejemplo 12 (ELISA monoetapa).

10 TABLA 9

Control de erradicación - Detección de catalasa de H. pylori en heces mediante ensayo ELISA monoetapa. Toma de muestras 4-6 semanas después de la terapia de erradicación

Pacien- te nº	Ensayo respirato- rio C ¹³	ELISA heces HP OD _{450-630nm}
131	negativo	0,024
132	negativo	0,012
138	negativo	0,024
147	negativo	0,016
148	negativo	0,014
149	negativo	0,019
151	negativo	0,018
154	negativo	0,012
155	negativo	0,011
158	negativo	0,013
159	negativo	0,023
161	negativo	0,025
165	negativo	0,013
166	negativo	0,014
167	negativo	0,183
168	negativo	0,016
172	negativo	0,015
177	negativo	0,015
180	negativo	0,146
182	negativo	0,026
187	negativo	0,014
188	negativo	0,017
194	negativo	0,020
195	negativo	0,015
199	negativo	0,013
205	negativo	0,035
206	negativo	0,020
213	negativo	0,018
215	negativo	0,014
216	negativo	0,034
217	negativo	0,014
219	negativo	0,014
223	negativo	0,086
224	negativo	0,020
227	negativo	0,139
245	negativo	0,094
246	negativo	0,120
250	negativo	0,019
251	negativo	0,042
253	negativo	0,034
255	negativo	0,033
256	negativo	0,041
270	negativo	0,053
271	negativo	0,033
275	negativo	0,040
283	negativo	0,036

5	284	negativo	0,018
	296	negativo	0,170
	303	negativo	0,064
10	308	negativo	0,029
	310	negativo	0,025
	311	negativo	0,013
	312	negativo	0,049
15	315	negativo	0,021
	318	negativo	0,037
	319	negativo	0,044
20	320	negativo	0,057
	322	negativo	0,019
	324	negativo	0,017
25	326	negativo	0,154
	327	negativo	0,016
	328	negativo	0,015
30	329	negativo	0,266
	330	negativo	0,035
	331	negativo	0,013
35	337	negativo	0,015
	338	negativo	0,051
	339	negativo	0,021
40	350	negativo	0,037
	353	negativo	0,019
	356	negativo	0,023
45	357	negativo	0,025

358	negativo	0,057
359	negativo	0,023
360	negativo	0,073
366	negativo	0,018
367	negativo	0,018
368	negativo	0,029
369	negativo	0,028
152	positivo	0,365
156	positivo	0,264
160	positivo	3,851
162	positivo	2,021
169	positivo	0,112
179	positivo	0,573
181	positivo	2,886
186	positivo	2,084
196	positivo	0,282
220	positivo	0,905
240	positivo	2,837
252	positivo	1,606
278	positivo	3,173
300	positivo	0,840
325	positivo	3,898
334	positivo	2,946
361	positivo	0,269
161/1799	positivo	0,263

En comparación con el ensayo de referencia, el estudio (97 pacientes) posee una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 95 % (corte: OD₄₅₀₋₆₃₀: 0,15).

En el ejemplo 14 se pone de manifiesto que el ensayo ELISA de heces de HP es idóneo no solo para la detección en un primer diagnóstico del *H. pylori*, sino también para el control de erradicación y para la documentación del curso o evolución de la erradicación.

Ejemplo 15

Clonación y determinación de secuencias de las regiones funcionales variables de inmunoglobulinas de líneas celulares de hibridoma

La totalidad del RNA se aisló a partir de líneas celulares de hibridoma que generan anticuerpos con arreglo a Chomczynski (Chomczynski, 1987). El cDNA correspondiente se sintetizó con arreglo a métodos estándar (Sambrook y col., 1989). Las regiones de DNA, que codifican la cadena ligera kappa y el seg-

ES 2 194 782 T3

mento Fd de cadena pesada (VH o bien CH1) de los anticuerpos en cuestión, se amplificaron con PCR. Para ello se aplicó el conjunto de cebador (primer) oligonucleótido mencionado en la tabla 10. El cDNA aislado de las distintas líneas celulares de hibridoma actuó como matriz.

5 El conjunto de cebador (primer) utilizado conduce en cada caso a un sitio de restricción 5'-Xho I y 3'-Spe I en los fragmentos Fd de cadena pesada así como a un sitio de restricción 5'-Sac I y 3'-Xba I en las cadenas ligeras kappa. Para la amplificación PCR de los fragmentos de DNA que codifican a los Fd de cadena pesada se utilizaron 11 cebadores 5'-VH distintos (MVH 1-8 y MULH 1-3), combinados en cada caso con el cebador 3'-VH MIgG2a (HP25.2m/2H10) o bien con el cebador 3'-VH MIgG1 (HP25.6m/1B5).
10 Para la amplificación de los fragmentos de DNA, que codifican las cadenas ligeras kappa, se combinaron 11 cebadores 5'-VK (MUVK 1-7 y MULK 1-4) en cada caso con el cebador 3'-VK 3'MUCK.

En todas las amplificaciones PCR se aplicó el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización a 94°C durante 30 s, anexión del cebador a 52°C durante 60 s, polimerización a 72°C durante 90 s. Este
15 programa se mantuvo durante 40 ciclos, seguidos por una operación final para completar los fragmentos a 72°C durante 10 min.

Los resultados de las amplificaciones PCR se separaron por electroforesis a través de gel de agarosa y se aislaron las bandas de DNA del peso molecular esperado.

20 Para el anticuerpo 25.2m/2H10, las bandas aisladas se sometieron seguidamente a una digestión de restricción empleando las enzimas Xho I y Spe I (cadenas pesadas) o bien Sac I y Xba I (cadenas ligeras) y los fragmentos resultantes se clonaron en el vector plásmido Bluescript KS (Stratagene), después de que este hubiera sido dividido con las enzimas de restricción Xho I y Spe I o bien Sac I y Xba I.

25 A continuación se analizaron las secuencias de los preparados de plásmido de los fragmentos clonados de cadenas pesadas y ligeras. Se eligieron secuencias que codifican regiones funcionales variables de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina (VH y VL, respectivamente). De este modo se pudo identificar para esta línea celular de hibridoma exactamente una región funcionalizada VH y una región
30 funcionalizada VL. Las secuencias funcionales VH y VL se reproducen en las figuras 1 y 2. Los cuatro primeros aminoácidos de la región VH se completaron por reclonación. La clonación y la secuenciación se realizaron con arreglo a métodos estándar (Sambrook y col., 1989).

35 Para el anticuerpo HP25.6m/1B5, a continuación se secuenciaron directamente las bandas aisladas y se identificó una cadena funcional ligera y una cadena funcional pesada. El fragmento Fd de cadena pesada y la cadena ligera se sometieron seguidamente a una digestión de restricción empleando las enzimas XhoI y SpeI (cadena pesada) o bien SacI y XbaI (cadena ligera) y los fragmentos resultantes se clonaron en el vector plásmido pBSIIIHisEx (Connex), después de que este se hubiera dividido con las enzimas de restricción Xho I y Spe I o bien Sac I y Xba I, y se volvió a secuenciar.

40 De este modo se logró identificar para esta línea celular de hibridoma exactamente una región funcional VH y una región funcional VL. Las secuencias funcionales VH y VL se reproducen en las figuras 3 y 4. En las secuencias VH y VL se representan los extremos N-terminales maduros, determinados mediante la secuenciación con un cebador líder (leader primer). La clonación y la secuenciación se efectuaron con
45 arreglo a métodos estándar (Sambrook y col., 1989).

50

55

60

ES 2 194 782 T3

TABLA 10

Lista de los cebadores (primer) empleados para la amplificación PCR de las regiones funcionales variables de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina (orientación 5'-3')

5

MVH1 (GC)AG GTG CAG CTC GAG GAG TCA GGA CCT

10

MVH2 GAG GTC CAG CTC GAG CAG TCT GGA CCT

MVH3 CAG GTC CAA CTC GAG CAG CCT GGG GCT

MVH4 GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGG GCA

15

MVH5 GA(AG) GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGA GGA

MVH6 GAG GTG AAG CTT CTC GAG TCT GGA GGT

MVH7 GAA GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGG GGA

20

MVH8 GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGA GCT

MULK1 GGG GAG CTC CAC CAT GGA GAC AGA CAC ACT CCT GCT AT

25

MULK2 GGG GAG CTC CAC CAT GGA TTT TCA AGT GCA GAT TTT CAG

MULK3 GGG GAG CTC CAC CAT GGA GWC ACA KWC TCA GGT CTT TRT A

MULK4 GGG GAG CTC CAC CAT GKC CCC WRC TCA GYT YCT KGT

30

MIgG1 TAT GCA ACT AGT ACA ACC ACA ATC CCT GGG

MIgG2a GAG AGA GGG GTT CTG ACT AGT GGG CAC TCT GGG CTC

MUVK1 CCA GTT CCG AGC TCG TTG TGA CTC AGG AAT CT

35

MUVK2 CCA GTT CCG AGC TCG TGT TGA CGC AGC CGC CC

MUVK3 CCA GTT CCG AGC TCG TGC TCA CCC AGT CTC CA

MUVK4 CCA GTT CCG AGC TCC AGA TGA CCC AGT CTC CA

40

MUVK5 CCA GAT GTG AGC TCG TGA TGA CCC AGA CTC CA

MUVK6 CCA GAT GTG AGC TCG TCA TGA CCC AGT CTC CA

MUVK7 CCA GTT CCG AGC TCG TGA TGA CAC AGT CTC CA

45

MULH1 GGG CTC GAG CAC CAT GGR ATG SAG CTG KGT MAT SCT CTT

MULH2 GGG CTC GAG CAC CAT GRA CTT CGG GYT GAG CTK GGT TTT

50

MULH3 GGG CTC GAG CAC CAT GGC TGT CTT GGG GCT GCT CTT CT

3`MUCK GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CAT TCC TGT TGA A

55

60

Bibliografía técnica

- 5 **Coller & Coller, 1983:** Coller, H.A., Coller, B.S., *Meth. Enzymol.* **121**:412-417
Harlow & Lane, 1988: Harlow, E., Lane, D., *Antibodies: A laboratory manual*, Cold
Spring Harbour Laboratory, New York
- 10 **Kearney et al., 1979:** Kearney, J. *Immunol.* **123**: 1548-1550
Laemmli, 1970: Laemmli, E.K., *Nature* **227**: 680-685
Peters & Baumgarten, 1990: Peters, J.H., Baumgarten, H. (Hrsg.), *Monoklonale
Antikörper*, Springer Verlag, Berlin
Fägerstam et al., 1990: Fägerstam, L.G. et al., *J. Mol. Recognit.* **3**: 208-214
Malmqvist, 1996: *Methods* **9**: 525-532
- 15 **Eschweiler et al., 1993:** Eschweiler, B., et al., *Zentralbl. F. Bakt.* **280**: 73-85
Pharmacia Biotech, 1994: *Monoclonal Antibody Purification Handbook*
Chomczynski, 1987: *Anal. Biochem.* **162**: 156-159
Sambrook et al., 1989: *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, second
edition
- 20 **Vaughan et al., 1998:** *Nature Biotechnology* **16**: 535-539
Orlandi et al., 1989: *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **86**: 3833-3837
Janeway & Travers, 1997: *Immunologie*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer
Verlag GmbH, Heidelberg
- 25 **Osborne et al., 1997:** *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**: 5-9
Stull und Szoka, 1995: *Pharm. Res.* **12**: 465-483
Frens, 1973: *Nat. Phys. Sci.* **241**, 20-23
Geoghegan and Ackerman, 1977: *J. of Histochemistry and Cytochemistry*, **25(11)**, 1187-1200
Slot, 1985: *Eur. J. Cell Biol.* **38**, 87-93
- 30 **Manos et al., 1998:** *Helicobacter* **3** (1), 28-38
Haque, 1993: *J. Infect. Dis.* **167**: 247-9
Park, 1996: *J. Clin. Microbiol.* **34**: 988-990
Hasan, 1994: *FEMS Microbiol. Lett.* **120**: 143-148
Koopmans, 1993: *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2738-2744
- 35 **Machnicka, 1996:** *Appl. Parasitol.* **37**: 106-110
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección de una infección de una bacteria acidorresistente del género *Helicobacter* en un mamífero, en el que

5 (a) se incuba una muestra de excrementos del mamífero empleando (aa) un receptor en condiciones que permitan la formación de un complejo de un antígeno de la bacteria acidorresistente con el receptor; o
 10 (ab) se incuban dos receptores distintos en condiciones que permitan la formación de un complejo de un antígeno de la bacteria acidorresistente con los dos receptores y en el que el receptor según (aa) o los receptores según (ab) se une(n) específicamente a un antígeno que, por lo menos en una parte del mamífero después de haber pasado el tracto intestinal, presenta una estructura que corresponde a la estructura nativa o a la estructura frente a la cual un mamífero produce o genera anticuerpos después de una infección o inmunización con la bacteria acidorresistente o con un extracto o con un lisado de la misma o con un fragmento de la misma o con un péptido sintético; y

15 (b) se detecta la formación de un complejo de antígeno-receptor según (a).

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la bacteria es de la especie *Helicobacter pylori* o *Helicobacter hepaticus*.

20 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el antígeno es un antígeno de una catalasa o de una metaloproteínasa.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el antígeno es un antígeno de *H. pylori*.

25 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 4, en el que el receptor/los receptores es/son anticuerpo(s), fragmento(s) o derivados(s) de los mismos o aptámero(s).

30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 5, en el que para la detección se emplea además una mezcla de receptores, en el que la mezcla de receptores actúa como capturadora del antígeno, cuando el receptor se emplea como detector del antígeno y la mezcla actúa como detector del antígeno, cuando el receptor se emplea como capturador del antígeno.

35 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la mezcla de receptores es un antisuero policlonal.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el antisuero policlonal se obtiene contra un lisado de la bacteria.

40 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el lisado es un lisado enriquecido con antígeno.

10. Procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, en el que el lisado es un lisado con menor concentración de antígenos inmunodominantes.

45 11. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el antisuero policlonal se obtiene contra un antígeno purificado o un antígeno de origen (semi)sintético.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 11, en el que el receptor y/o la mezcla de receptores fija(n) epítope(s) de conformación.

50 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 5 a 12, en el que la cadena pesada del anticuerpo fijado con un epítope de catalasa posee por lo menos una de las siguientes CDR y con preferencia la CDR3:

55 CDR1: NYWIH
 CDR2: YINPATGSTSYNQDFQD
 CDR3: EGYDGFDS

60 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la cadena pesada presenta las tres CDR mencionadas.

15. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, en el que la secuencia de DNA que codifica la cadena pesada del anticuerpo contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3

ES 2 194 782 T3

y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

5 CDR1: AACTACTGGA TTCAC
CDR2: TACATTAATC CTGCCACTGG TTCCACTTCT
TACAATCAGG ACTTTCAGGA C
CDR3: GAGGGGTACG ACGGGTTTGA CTCC

16. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 5 a 12, en el que la cadena ligera de un anticuerpo que fija un epítoto de catalasa posee por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

15 CDR1: SASSSVNYMY
CRD2: DTSKLAS
CRD3: QQWSSNPYT

17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que la secuencia de DNA que codifica la cadena ligera del anticuerpo contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

20 CDR1: AGTGCCAGCT CAAGTGTA AAA TTACATGTAC
CDR2: GACACATCCA AATTGGCTTC T
CDR3: CAGCAGTGGA GTAGTAATCC GTACACG

25 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 5 a 12, en el que la cadena pesada de un anticuerpo que fija un epítoto de catalasa presenta por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

30 CDR1: DTYVH
CDR2: KIDPANGKTKYDPIFQA
CDR3: PIYYASSWFAY

19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que la secuencia de DNA que codifica la cadena pesada del anticuerpo contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

35 CDR1: GACACCTATGTGCAC
CDR2: AAGATTGATCCTGCGAATGGTAAA ACTAAATAT
GACCCGATATTCCAGGCC
CDR3: CCCATTTATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCTTAC

40 20. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 5 a 12, en el que la cadena ligera de un anticuerpo que fija un epítoto de catalasa posee por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

45 CDR1: KASQDVGTSVA
CRD2: WTSTRHT
CDR3: QQYSSSPT

50 21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que la secuencia de DNA que codifica la cadena ligera del anticuerpo contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

55 CDR1: AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTTCTGTTGCC
CDR2: TGGACATCCACCCGGCACACT
CDR3: CAGCAATATAGCAGCTCTCCCACG

22. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 5 a 21, en el que los anticuerpos en las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas poseen las secuencias de aminoácidos representadas en las figuras 1 y 2, 3 y 4.

60 23. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 5 a 22, en el que las regiones codificadoras de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas tienen las secuencias de DNA representadas en las

figuras 1 y 2, 3 y 4.

24. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 23, en el que antes de la incubación con los anticuerpos se efectúan con la muestra de heces las operaciones siguientes:

- (a) la muestra de heces se resuspende en un tampón de resuspensión en una proporción de 1:3 a 1:25, con preferencia de 1:5 a 1:10 y con preferencia especial de 1:5 y
- (b) se mezclan en una mezcladora Vortex.

25. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 24, en el que la detección de la formación de un complejo de antígeno-receptor o de un complejo mixto de antígeno-receptor-receptor se efectúa en la etapa (b) mediante un proceso inmunológico.

26. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 25, en el que la detección de la formación de un complejo de antígeno-receptor o de un complejo mixto de antígeno-receptor-receptor se efectúa en la etapa (b) mediante un ensayo ELISA, RIA, Western Blot o mediante un proceso inmunocromatográfico.

27. Procedimiento según la reivindicación 25 ó 26, en el que se utiliza para el ensayo RIA o ELISA el mismo receptor para la fijación sobre la fase sólida que para la detección del epítotope.

28. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 27, en el que el receptor está fijado sobre un soporte.

29. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 28, en el que el receptor es un anticuerpo monoclonal de ratón.

30. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 29, en el que el procedimiento es un ensayo ELISA de una sola etapa.

31. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 29, en el que el procedimiento es un ensayo ELISA de tres etapas.

32. Procedimiento según la reivindicación 28, en el que el material del soporte es un material poroso.

33. Procedimiento según la reivindicación 28 ó 32, en el que el material soporte es una tirilla de ensayo.

34. Procedimiento según la reivindicación 28, 32 ó 33, en el que el material soporte es de celulosa o de un derivado de celulosa.

35. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 34, en el que en lugar de una muestra de heces se utiliza para la detección placa dental o saliva.

36. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 35, **caracterizado** porque es un procedimiento automatizado.

37. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 36, en el que el mamífero es un hombre.

38. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1, 2, de 4 a 12 y de 24 a 37, en el que el antígeno es el antígeno de una ureasa.

39. Procedimiento según la reivindicación 38, en el que la cadena pesada del anticuerpo que fija un epítotope de la β -ureasa contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

CDR1:	GFTFSSHFMS
CDR2:	SISSGGDSFYPSLKG
CDR3:	DYSWYALDY

o bien

ES 2 194 782 T3

CDR1: GYAFSTSWMN
CDR2: RIYPGDGDTNYNGKFKG
CDR3: EDAYYSNPYSLDY

5 40. Procedimiento según la reivindicación 39, en el que la secuencia de DNA que codifica la cadena pesada del anticuerpo contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

10 CDR1: GG CTACGCATTC AGTACCTCCT GGATGAAC
CDR2: CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA
AGTTCAAGGG C
CDR3: GAG GATGCCTATT ATAGTAACCC CTATAGTTTG GACTAC

o bien

15 CDR1: GG ATTCACTTTC AGTAGCCATT TCATGTCT
CDR2: TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCTAT CCAGACAGTC
TGAAGGGC
20 CDR3: GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA C

41. Procedimiento según la reivindicación 38, en el que la cadena ligera del anticuerpo, que fija un epítipo de la β -ureasa, contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

25 CDR1: RASQSIGTRIH
CDR2: YGSESES
CDR3: QQSNTWPLT

o bien

30 CDR1: HASQNINVWLS
CDR2: KASNLHT
CDR3: QQGRSYPLT

35 42. Procedimiento según la reivindicación 41, en el que la secuencia de DNA que codifica la cadena ligera del anticuerpo contiene por lo menos una de las CDR siguientes, con preferencia la CDR3 y con preferencia especial las tres CDR siguientes:

40 CDR1: A GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGAATAC AC
CDR2: TAT GGTTCTGAGT CTATCTCT
CDR3: CAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC G

o bien

45 CDR1: C ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTTGGTTAA GC
CDR2: AAG GCTTCCAAC TGCACACA
CDR3: CAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC G

50 43. Anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo, que posee una región V que contiene una combinación de las regiones CDR representadas en una de las reivindicaciones de 13 a 21.

44. Anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo según la reivindicación 43, que contiene por lo menos uno de las regiones V representadas en las figuras 1 y 2 o bien 3 y 4.

55 45. Anticuerpo monoclonal, fragmento o derivado del mismo según la reivindicación 43 ó 44, que es un anticuerpo de ratón o un fragmento o derivado del mismo o un anticuerpo quimérico, con preferencia un anticuerpo humanizado o un fragmento o un derivado del mismo.

60 46. Uso de una composición de diagnóstico que contenga un receptor, definido en una de las reivindicaciones de 3 a 37 y de 43 a 45, que fija específicamente un antígeno de una catalasa de *Helicobacter* o una metaloproteinasa de *Helicobacter* y que está fijado eventualmente sobre un material soporte, para detectar la bacteria *Helicobacter* en las heces.

47. Dispositivo de ensayo para detectar por lo menos uno de los epítopes definidos en las reivindicaciones anteriores, que consta de

5 (a) un receptor, definido en una de las reivindicaciones de 3 a 37 y de 43 a 45, que fija específicamente un antígeno de una catalasa de *Helicobacter* o de una metaloproteinasa de *Helicobacter*, y está fijado sobre un material soporte; y

(b) un dispositivo para procesar y analizar las muestras de heces.

10

48. Dispositivo de ensayo para detectar por lo menos un epítopo definido en una de las reivindicaciones anteriores, que comprende

15 (a) un receptor, definido en una de las reivindicaciones de 3 a 37 y de 43 a 45, que que fija específicamente un antígeno de una catalasa de *Helicobacter* o de una metaloproteinasa de *Helicobacter*, dicho receptor está conjugado con oro coloidal, partículas de látex o bien otras partículas colorantes, cuyo tamaño se sitúa por ejemplo entre 5 nm y 100 nm, con preferencia entre 20 nm y 60 nm y con preferencia especial, entre 40 nm y 60 nm (oro) y entre 200 nm a 500 nm (látex); y (b) un dispositivo para procesar y analizar muestras de heces.

20

49. Kit que contiene

25 (a) un receptor, definido en una de las reivindicaciones de 3 a 37 y de 43 a 45, que fija específicamente un antígeno de una catalasa de *Helicobacter* o de una metaloproteinasa de *Helicobacter*, y está eventualmente fijado sobre un material soporte; y eventualmente además

(b) un dispositivo para procesar y analizar las muestras de heces.

30 50. Envase que contiene el dispositivo de ensayo según la reivindicación 47 ó 48 o el kit de la reivindicación 49.

35 51. Uso de un receptor único, que fija específicamente un antígeno de una bacteria acidorresistente del género *Helicobacter*, o de dos receptores que fijan específicamente dos epítopes del mismo antígeno, en el que el antígeno es una catalasa de *Helicobacter* o una metaloproteinasa de *Helicobacter*, para detectar en las heces la infección de esta bacteria en un mamífero.

40

45

50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

Fig. 1

E V Q L L E Q P G A
 GAGGTGCAGCTGCTCGAGCAGCCTGGGGCT 30
 E L A K P G A S V K
 GAACTGGCAAACCTGGGGCCTCAGTGAAG 60
 M S C K A S G Y T F
 ATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTT 90
 T N Y W I H W V K Q
 ACTAACTACTGGATTCACTGGGTGAAACAG 120
 R P G Q G L K W I G
 AGGCCTGGACAGGGTCTGAAATGGATTGGA 150
 Y I N P A T G S T S
 TACATTAATCCTGCCACTGGTTCCACTTCT 180
 Y N Q D F Q D R A T
 TACAATCAGGACTTTCAGGACAGGGCCACT 210
 L T A D K S S T T A
 TTGACCGCAGACAAGTCCTCCACCACAGCC 240
 Y M Q L T S L T S E
 TACATGCAGCTGACCAGCCTGACATCTGAG 270
 D S S V Y Y C A R E
 GACTCTTCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAG 300
 G Y D G F D S W G Q
 GGGTACGACGGGTTTGACTCCTGGGGCCAA 330
 G T T L T V S S
 GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA 360

Fig. 2

E L V L T Q S P A I
 GAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATC 30
 M S A S P G E K V T
 ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACC 60
 M T C S A S S S V N
 ATGACCTGCAGAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAT 90
 Y M Y W Y Q Q K S G
TACATGTACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGC 120
 T S P K R W I Y D T
 ACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACA 150
 S K L A S G V P A R
TCCAAATTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGC 180
 F S G S G S G T S Y
 TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTAC 210
 S L T L S S M E A E
 TCTCTCACACTCAGCAGCATGGAGGCTGAA 240
 D A A T Y Y C Q Q W
 GATGCCGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGG 270
 S S N P Y T F G G G
AGTAGTAATCCGTACACGTTCGGAGGGGGG 300
 T K L E I K
 ACCAAGCTGGAGATAAAA 330

Fig. 3

+1 E V Q L Q Q S G A E
 GAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAG 30
 +1 L V K P G A S V K L
 CTTGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTCAAGTTG 60
 +1 S C T S S G F N I K
 TCCTGCACATCTTCTGGCTTCAACATTA 90
 +1 D T Y V H W M K Q R
GACACCTATGTGCACTGGATGAAACAGAGG 120
 +1 P E Q G L E W I G K
 CCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAAG 150
 +1 I D P A N G K T K Y
ATTGATCCTGCGAATGGTAAAATAAATAT 180
 +1 D P I F Q A K A T M
GACCCGATATTCCAGGCCAAGGCCACTATG 210
 +1 T A D A S S N T A Y
 ACAGCAGACGCATCCTCCAATACAGCCTAC 240
 +1 L Q L S S L T S E D
 CTGCAACTCAGCAGCCTGACTTCTGAGGAC 270
 +1 T A V Y Y C A L P I
 ACTGCCGTCTATTACTGTGCTCTCCCCATT 300
 +1 Y Y A S S W F A Y W
TATTACGCTAGTTCCTGGITTTGCTTACTGG 330
 +1 G Q G T L V T V S A
 GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA 360

Fig. 4

```

+1  D  I  V  M  T  Q  S  H  K  F
    GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTC 30
+1  M  S  T  S  V  G  D  R  V  S
    ATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTTCAGC 60
+1  I  T  C  K  A  S  Q  D  V  G
    ATCACCTGCAAAGGCCAGTCAGGATGTGGGT 90
+1  T  S  V  A  W  Y  Q  Q  K  P
    ACTTCTGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCT 120
+1  G  H  S  P  K  L  L  I  Y  W
    GGGCACTCTCCTAAATTACTGATTTACTGG 150
+1  T  S  T  R  H  T  G  V  P  D
    ACATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGAT 180
+1  R  F  T  G  S  G  S  G  T  D
    CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT 210
+1  F  I  L  T  I  S  N  V  Q  S
    TTCATTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCT 240
+1  E  D  L  A  D  Y  F  C  Q  Q
    GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCCAGCAA 270
+1  Y  S  S  S  P  T  F  G  G  G
    TATAGCAGCTCTCCCACGTTTCGGAGGGGGG 300
+1  A  K  V  E  I  K
    GCCAAGGTGGAAATAAAA 330

```

+1 D I L L T Q S P A I L S V S P G E

GACATCTTGC TGA⁺CTCAGTC TCCAGCCATC CTGTCTGTGA GTC⁺CAGGAGA 50

+1 R V S F S C R A S Q S I G T R I H

AAGAGTCAGT TTCTCCTGCA GGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGAATAC 100

+1 W Y Q Q R T N G S P R L L I K Y

ACTGGTATCA ACAAGAACA AATGGTTCTC CAAGGCTTCT CATAAAGTAT 150

Fig. 5

+1 G S E S I S G I P S R F S G S G S

GGTCTGAGT CTATCTCTGG GATCCCTTCC AGGTTTAGTG GCAGTGGATC 200

+1 G T D F S L S I N S V E S E D I A

AGGGACAGAT TTTAGTCTTA GCATCAACAG TGTCCGAGTCT GAAGATATTG 250

+1 D Y Y C Q Q S N T W P L T F G A

CAGATTATTA CTGT CAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC GTTCGGTGCT 300

+1 G T K L E L K

GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A

350

+1 E V Q L L E Q S G A E L V K P G A
 GAGGTGCAGC TGCTCGAGCA GTCTGGAGCT GAGCTGGTGA AGCCTGGGGC 50
 +1 S V K I S C K A S G Y A F S T S W
 CTCAGTGAAG ATTTCCCTGCA AGGCTTCTGG CTACGCATTC AGTACCCTCCT 100
 +1 M N W V K Q R P G K G L E W I G
GGATGAAC TG GGTGAAACAG AGGCCCTGGAA AGGGTCTTGA GTGGATTGGA 150
 +1 R I Y P G D G D T N Y N G K F K G
CGGATTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA AGTCAAGGG 200
 +1 K A T L T A D K S S S T A Y M Q L
CAAGGCCACA CTGACTGCAG ACAAAATCCCTC CAGCACAGCC TACATGCAAC 250
 +1 N S L T S E D S A V Y F C V R E
 TCAACAGCCT GACATCTGAG GACTCTGCGG TCTACTTCTG TGTAAGA GAG 300
 +1 D A Y Y S N P Y S L D Y W G Q G T
GATGCCATT ATAGTAAACCC CTATAGTTTG GACTACTG TGGG GTC AAGGAAC 350
 +1 S V T V S S
 CTCAGTCACC GTCTCCCTCA 400

Fig. 6

+1 E L Q M T Q S P S L S A S L G D

GAGCTCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCAGT CTGTCTGCAT CCCTGGAGA 50

+1 T I T I T C H A S Q N I N V W L S

CACAATTACC ATCACTTGC C ATGCCAGTCA GAACATTAA GTTGGTTAA 100

+1 W Y Q Q K P G D I P K L L I Y K

GCTGGTATCA GCAGAAACCA GGAGATATCC CTAAACTATT GATCTAT AAG 150

+1 A S N L H T G V P S R F S G S G S

Fig. 7

GCTTCCAACT TGCACACAGG CGTCCCATCA AGGTTTAGTG GCAGTGGATC 200

+1 G T G F T L V I S S L Q P E D I A

TGGAACAGGT TTCACATTAG TCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGACATTG 250

+1 T Y Y C Q Q G R S Y P L T F G A

CCACTPACTA CTGT CAACAG GGTCCGAAGT ATCCTCTCAC GTTCGGTGCT 300

+1 G T K L E L K

GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A

350

+1 E V Q L L E E S G G L V K P G G

GAGTGCAGC TGCTCGAGGA GTCTGGGGGA GGCTTAGTGA AGCCTGGAGG 50

+1 S L Q L S C S A S G F T F S S H F

GTCCCTGCAA CTCCTCCTGTT CAGCCTCTGG ATTCACCTTC AGTAGCCATT 100

+1 M S W V R Q T P E K R L E W V A

TCATGTCTGG GGTTCGCCAA ACTCCAGAGA AGAGGCTGGA GTGGGTCGCA 150

+1 S I S S G G D S F Y P D S L K G R

TCCATTAGTA GGGTGGTGA CAGTTTCTAT CCAGACAGTC TGAAGGGCCG 200

+1 F A I S R D N A R N I L F L Q M S

ATTCGCCATC TCCAGAGATA ATGCCAGGAA CATCCTGTTC CTGCAAATGA 250

+1 S L R S E D S A M Y F C T R D Y

GCAGTCTGAG GTCTGAGGAC TCGGCCATGT ATTTCTGTAC AAGA GACTAC 300

+1 S W Y A L D Y W G Q G T S V T V S

TCTTGGTATG CTTTGGACTA CTGGGGTCAA GGAACCTCAG TCACCGTCTC 350

+1 S

CTCA

400

Fi 08

Fig. 9

