



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 382**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02733963 .9**

96 Fecha de presentación : **28.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1384075**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2004**

54

Título: **Métodos de detección de enfermedades renales tempranas en animales.**

30

Prioridad: **28.03.2001 US 279391 P**  
**21.12.2001 US 342268 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.04.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.04.2011**

73

Titular/es: **HESKA CORPORATION**  
**3760 Rocky Mountain Avenue**  
**Loveland, Colorado 80538, US**

72

Inventor/es: **Andrews, Janet, S.;**  
**McDonald, Thomas;**  
**Jensen, Wayne, A. y**  
**Weber, Annika**

74

Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 356 382 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos de detección de enfermedades renales tempranas en animales.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la detección de la enfermedad renal temprana en animales, y más particularmente a la utilización de la microalbuminuria como marcador de la enfermedad renal temprana.

10 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad glomerular es un término amplio utilizado para describir un número de enfermedades renales que pueden conducir a insuficiencia renal y la muerte. El daño al glomérulo incrementa la permeabilidad capilar a proteínas tales como la albúmina, que resultan en la presencia de proteínas en la orina (referido como proteinuria).

En humanos, la proteinuria puede resultar de un número de enfermedades, incluyendo diabetes, hipertensión y nefropatía por IgA. La prueba convencional de proteinuria en seres humanos es utilizar un análisis de la proteína de tira reactiva normal como se describe, por ejemplo, en Bakris, Curr. Opin. in Neph. y Hipertensión, 5:219-223 (1996). Las tiras reactivas que son químicamente impregnadas con ácido sulfosalicílico para medir proteínas en una muestra están disponibles comercialmente, por ejemplo de Boehringer-Mannheim, Germany (Chemstrips™) y Ames Co., USA (Albustix™). Un inconveniente de estos ensayos de tiras reactivas es que requieren una cantidad significativa de proteína en la orina para ser detectada. Cantidades de proteínas en seres humanos de menos de 300 miligramos por día no son detectables por el análisis de tira reactiva, sin embargo, la proteinuria puede estar aun presente. Otro inconveniente de estos ensayos a base de proteínas es que son incapaces de discriminar entre diferentes tipos de proteínas (ej., albúmina, globulina, etc.) que pueden estar presentes en la orina. La proteinuria puede resultar de la fuga de proteínas séricas en filtrado glomerular debido a glomerulonefritis; sin embargo, la proteinuria puede también estar presente debido a problemas no relacionados con enfermedad renal tales como infecciones de la vejiga o una dieta alta en proteínas.

Cantidades mas bajas de albúmina en la orina, a lo que se hace referencia como "microalbuminuria", indican un nivel de albúmina que es mayor que en los pacientes normales, pero menor que en los pacientes con proteinuria franca, i.e., clínicamente proteinuricos. En seres humanos, microalbuminuria se refiere a cantidades de albúmina entre 30 miligramos por día y 300 miligramos por día según Watts, Clin. Chem., 32(8):1544-1548 (1986). Los métodos para detectar microalbuminuria humana son conocidos e incluyen métodos que utilizan un anticuerpo de albúmina anti-humano para detectar cantidades de albúmina humana que no son detectables por métodos conocidos de tiras reactivas. Tales métodos para la detección de microalbuminuria humana son descritos, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 5,246,835, publicado el 21 de septiembre de 1993 a Suzuki *et al.*

Aunque la microalbuminuria puede ser detectada en humanos, la utilidad de detectar microalbuminuria en humanos puede ser muy limitada, al menos según algunos informes. Por ejemplo, utilizar las pruebas de microalbuminuria para predecir la enfermedad renal solo ha sido recomendado para los seres humanos con diabetes según Bakris, *supra*. Dado que los trastornos distintos de la diabetes, como la hipertensión, enfermedad cardíaca y la neuropatía IgA no dan lugar a la microalbuminuria consistente en seres humanos, según Bakris, *supra*, la detección de microalbuminuria tiene un valor predictivo pobre para la enfermedad renal mas avanzada asociada con estos estados de trastornos no diabéticos. En consecuencia, usar pruebas de microalbuminuria para detectar el potencial o la enfermedad renal temprana en pacientes humanos no diabéticos es generalmente no recomendado por Bakris, *supra*.

La enfermedad renal es también un problema de salud significativa en animales de compañía, en particular perros y gatos. En perros, la causa primaria de la enfermedad renal es el daño a los glomérulos del riñón. Aunque el daño glomerular en perros puede ocurrir en cualquier numero de formas, es mas comúnmente causado cuando complejos inmunes circulantes (i.e., anticuerpos/complejos antígeno) son depositados en los capilares glomerular como consecuencia de una enfermedad sistemática como se describe en Batamuzi, *et al.*, Vet Record, 143; 16-20 (1988). Varias enfermedades han sido implicadas en la patogénesis de la formación e complejos inmunes, que incluyen por ejemplo, dirofilariosis y otras infecciones parasitarias, diabetes, hipotiroidismo y otros.

La enfermedad renal temprana en la medicina veterinaria ha sido caracterizado por cambios glomerulares detectable por histopatología, que incluyen el uso de microcopia de luz o en ocasiones inmunofluorescencia como se reporta en Vaden, Proc. 17th ACVIM, 420 (1999). Sin embargo, según se informa en ese documento, estas técnicas pueden conducir a errores de diagnostico de la causa de la enfermedad renal. La determinación de la causa de la enfermedad renal es útil en la formulación de un régimen de tratamiento adecuado. Por ejemplo, si la causa de la enfermedad renal es inmune mediada, entonces la terapia inmunosupresora puede ser adecuada. Sin embargo, ensayos disponibles actualmente para detectar la microalbuminuria humana no son lo suficientemente sensibles para detectar la microalbuminuria canina.

65 WO 00/37944 describe un método para la detección y tratamiento de la enfermedad renal.

## ES 2 356 382 T3

EP 0 198 639 se refiere a un método para la determinación de la albúmina.

Así, existe la necesidad de ensayos para detectar la enfermedad renal temprana en animales de compañía. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas.

5

### Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método para la detección de la enfermedad renal temprana en cánidos, felinos y equinos. Los animales preferidos para la prueba de la enfermedad renal temprana son los perros, gatos y caballos. Realizaciones de método descritas en este documento están basadas en el descubrimiento de que la presencia de albúmina en una muestra de una animal, en el rango de 10  $\mu\text{g/ml}$  a 300  $\mu\text{g/ml}$  puede ser usada como un indicador de la enfermedad renal temprana. La muestra a probar es una muestra de orina.

Cualquier ensayo capaz de detectar albúmina puede ser utilizada en el método instantáneo aunque métodos preferidos emplean ensayos basados inmunológicamente, preferiblemente ensayos de un solo paso. El ensayo de mayor preferencia es un ensayo basado inmunológicamente que utiliza un anticuerpo anti-albúmina.

Cualquier anticuerpo que se una a la albúmina del animal experimentado puede ser utilizado; anticuerpos preferidos se unen a la albúmina canina y/o albúmina felina y/o albúmina equina. Anticuerpos preferidos son TNB1, TNB3, TNB4, TNB5, TNB6, H352, H386, H387, H388, H389, H390, H391, H393, H394, H395, H396, H397, H398, H399, H400, H401, y H402. Células cultivadas producen anticuerpos adecuados para la práctica de la siguiente invención.

25

### Descripción detallada de la invención

La presente invención generalmente se refiere a un método nuevo en la detección de la enfermedad renal temprana en cánidos, felinos y equinos y para el uso en el de nuevos anticuerpos que selectivamente se unen a la albúmina de uno o más especies de animales. Mas particularmente, la presente invención se refiere al descubrimiento de que la presencia de microalbuminuria puede ser usada para predecir la enfermedad renal temprana en cánidos, felinos y equinos, particularmente las enfermedades renales autoinmunes. Por lo tanto, los métodos pueden también ser útiles para la prescripción de un tratamiento para un animal. Un tratamiento adecuado puede ser diseñado para retrasar o prevenir la aparición de la última etapa de la enfermedad renal. Ejemplos de tal tratamiento incluyen, por ejemplo, modificación farmacológica o de la dieta. La presente invención es también útil en el monitoreo de la efectividad de un tratamiento prescrito. La invención proporciona un método según la reivindicación 1. Una cantidad de albúmina en un rango de unos 10  $\mu\text{g/ml}$  a unos 300  $\mu\text{g/ml}$  en la muestra es indicativa de la enfermedad renal temprana.

Debe notarse que el término “una” entidad se refiere a uno o mas de esa entidad. Por ejemplo, una proteína se refiere a una o mas proteínas o al menos una proteína. Como tal, los términos “un” “uno o mas” y “al menos uno” pueden usarse indistintamente en este documento. Los términos “que comprende” “que incluye” y “que tiene” pueden también usarse indistintamente. En adición, los términos “cantidad” y “nivel” son también intercambiables y pueden usarse para describir una concentración o una cantidad específica. Además, el termino “seleccionado del grupo consistente de” se refiere a uno o mas miembros del grupo en la lista que sigue, que incluye mezclas (i.e., combinaciones) de dos o mas miembros.

Como se usa en este documento, el termino “enfermedad renal” es definido como una disfunción del proceso de filtración glomerular. La disfunción glomerular puede ser transitoria o puede ser crónica, dependiendo de la causa subyacente de la enfermedad. Una consecuencia de la disfunción glomerular es que las proteínas que son normalmente retenidas en la sangre, fugan a través del glomérulo, en el filtrado glomerular y finalmente en la orina. Un ejemplo de una proteína que puede estar presente en la orina debido a la disfunción glomerular es la albúmina y su presencia en la orina a niveles bajos ha sido denominado microalbuminuria. El termino “microalbuminuria”, como se usa en este documento, se refiere a una cantidad de albúmina que esta presente en una muestra en un rango de unos 10  $\mu\text{g/ml}$  a unos 300  $\mu\text{g/ml}$  cuando la muestra se normaliza a un peso específico de 1.010 gramos/mililitro (g/ml). Esta es mayor que la cantidad encontrada en animales saludables que es normalmente bajo, i.e., menos de 10  $\mu\text{g/ml}$ . La microalbuminuria puede surgir como una consecuencia de daño al riñón que resulta de, por ejemplo, glomerulonefritis mediada por complejos inmunes. Como se usa en este documento, el termino “enfermedad renal de ultima fase” es usado para definir un estado en el cual un animal ha perdido 70% o mas de su función renal, con su correspondientes niveles elevados de metabolitos en el suero del animal, en particular el nitrógeno de sangre-urea (NSU) y niveles de creatinina sérica. Como se usa en este documento, el termino “enfermedad renal temprana” es definido como la presencia de microalbuminuria en un animal en la ausencia de cambios detectables en la función renal (i.e., NSU incrementado, creatinina serica o disminución de la capacidad de concentrar orina). Como tal, un nivel de albúmina en una muestra de orina de un rango de unos 10  $\mu\text{g/ml}$  a unos 300  $\mu\text{g/ml}$  cuando la muestra se normaliza a una gravedad específica de 1.010 g/ml es indicativo de la enfermedad renal temprana.

65

Animales preferidos se incluyen, pero no se limitan a, gatos, perros y caballos.

## ES 2 356 382 T3

Como se usa en este documento, un gato se refiere a cualquier miembro de la familia de gatos (i.e. Felidae), incluyendo gatos domésticos, gatos salvajes y gatos del zoológico. Ejemplos de gatos se incluyen, pero no se limitan a, gatos domésticos, leones, tigres, leopardos, panteras, jaguares, gatos monteses, linceos, jaguares, guepardos, servales. Un gato preferido es un gato doméstico. Como se usa en este documento, un perro se refiere a cualquier miembro de la familia de Canidae, incluyendo, pero limitado a, perros domésticos, perros salvajes, zorros, lobos, chacales y coyotes y otros miembros de la familia Canidae. Un perro preferido es un perro doméstico. Como se usa en este documento, un caballo se refiere a cualquier miembro de la familia Equidae. Un équido es un mamífero ungulado y incluye, pero no está limitado a, caballos domésticos y caballos salvajes, tales como, caballos, asnos, burros y cebras. Caballos preferidos incluyen caballos domésticos, incluyendo caballos de carrera.

En una realización de la presente invención, una muestra se obtiene, o recolecta, de un animal para la detección de microalbuminuria. El animal puede o no ser sospechoso de tener la enfermedad renal en fase de inicio. Una muestra es cualquier espécimen obtenido del animal que puede ser usada para medir la fuga de albúmina del glomérulo.

La orina es la muestra utilizada. Las muestras de orina pueden ser recolectadas de los animales por métodos conocidos en la materia, que incluye, por ejemplo, recolectar mientras el animal está miccionando, o recolectar mediante cateterización, o mediante cistocentesis. La orina puede ser refrigerada o congelada antes del ensayo, pero es preferible que se ensaye pronto antes de la recolección.

Aunque no es necesaria para la presente invención, la muestra puede ser pretratada como se desea. Por ejemplo, la muestra puede normalizarse a un peso específico deseado. La normalización de la muestra por métodos de dilución apropiados conocidos en la materia permite la cuantificación de la microalbuminuria independiente de la concentración (ej., peso específico) de la muestra. Aunque cualquier peso específico deseado puede ser fácilmente seleccionada por aquellos expertos en la materia, un peso específico particularmente adecuado es de 1.010. Si otro valor de peso específico es deseado para la normalización de una muestra, aquellos expertos en la materia pueden fácilmente terminar las cantidades adecuadas de albúmina que entran en la definición de la microalbuminuria para el peso específico deseado.

Después de obtener la muestra, el nivel de albúmina en esa muestra es determinado. Como se usa en este documento, los términos “determinar,” “determinar el nivel de la albúmina,” “determinar la cantidad de albúmina,” “determinar el nivel de albúmina” y similares pretenden abarcar cualquier técnica que puede ser usada para detectar o medir la presencia de albúmina en una muestra. La albúmina es un ejemplo de un analito. El término “analito,” como se usa en este documento, es usado para describir cualquier molécula o compuesto presente en una muestra. Tales técnicas pueden dar resultados cualitativos o cuantitativos. Los niveles de albúmina pueden ser determinados mediante la detección de la proteína albúmina en su totalidad o mediante la detección de fragmentos, productos en degradación o de reacción de la albúmina. En un método preferido, el nivel de albúmina se determina utilizando un compuesto adecuado ligante de albúmina.

Como se usa en este documento, los términos “molécula ligante de albúmina”, “compuesto ligante de albúmina”, “compuesto anti-albúmina”, y similares se utilizan indistintamente y se refieren a cualquier molécula que se une a la albúmina y forma un complejo estable. Un compuesto ligante de albúmina preferido es uno que selectivamente une la albúmina de un animal. El término “selectivamente une la albúmina” significa que preferentemente se une a la albúmina en lugar de unirse a otras proteínas relacionadas con la albúmina. Un compuesto ligante de albúmina particularmente útil es un anticuerpo anti-albúmina. Como se usa en este documento, los términos “anticuerpo anti-albúmina,” “anticuerpo a la albúmina,” “anticuerpo a la albúmina animal,” “especificidad de anticuerpos con la albúmina de animales,” “anticuerpo albúmina animal,” y similares se refieren a un anticuerpo que une de manera preferencial la albúmina de uno o más animales. Un anticuerpo anti-albúmina particularmente adecuado se une de forma preferencial a la albúmina canina, felina y/o equina en lugar de unirse a las proteínas canina, felina o equina diferentes sin relación. Otro anticuerpo anti-albúmina particularmente adecuado se une de manera preferencial a la albúmina canina en lugar de unirse a una proteína canina diferente sin relación. Otro anticuerpo particularmente adecuado a la albúmina de animales de compañía se une de manera preferencial a la albúmina felina en lugar de unirse a una proteína felina diferente sin relación. Otro anticuerpo particularmente adecuado a la albúmina de animales de compañía se une de manera preferencial a la albúmina equina en lugar de unirse a una proteína equina diferente sin relación.

La presente invención también utiliza anticuerpos aislados (i.e., retirados de su medio natural) que de forma selectiva se unen a la albúmina de una o más especies de animales. Anticuerpos aislados para su uso en la presente invención pueden incluir anticuerpos en el suero, o anticuerpos que han sido purificados en diversos grados. Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden ser policlonales o monoclonales, o pueden ser equivalentes funcionales como los fragmentos del anticuerpo y anticuerpos diseñados genéticamente, que incluyen anticuerpos de cadena simple o anticuerpos quiméricos que se pueden unir a uno o más epítopos de albúmina. Un método adecuado para producir anticuerpos efectivos para el uso en la presente invención incluye (a) la administración a un animal una cantidad efectiva de una proteína, péptido o mimetope del mismo para producir los anticuerpos y (b) la recuperación de los anticuerpos. Los anticuerpos contra las proteínas definidas o mimetopes pueden ser ventajosos dado que tales anticuerpos no están sustancialmente contaminados con anticuerpos contra las sustancias que otro modo podría causar interferencias en un ensayo de diagnóstico. Los métodos para producir tales anticuerpos son conocidos en la materia y están descritos en detalle en Harlow *et al.*, *Antibodies, a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Labs Press, 1988), e incluyen inmunizar a los animales para producir las preparaciones de los anticuerpos policlonales que se recuperan

de, por ejemplo, fluido de ascitis y purificados por métodos conocidos en la materia para obtener preparaciones que son reactivas a la albúmina animal. Muchas especies tienen proteínas que comparten secuencias cercanamente relacionadas y por tanto puede ser difícil si se utiliza protocolos de inmunización estándar para producir anticuerpos que reconocen una proteína de una sola especie. Por lo tanto, la modificación de métodos estándar utilizados para producir anticuerpos, tales como, por ejemplo, técnicas de hibridación sustractiva, son también contempladas. Tales modificaciones pueden ser aquellas conocidas por los expertos en la materia o las técnicas modificadas adicionalmente como se describe dentro de esta solicitud. En otro método, los anticuerpos para el uso en la presente invención se producen de forma recombinante usando técnicas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Labs Press, 1989).

Como se apreció previamente, otros métodos adecuados incluyen la producción de anticuerpos monoclonales. En pocas palabras, los anticuerpos monoclonales son producidos de la fusión de células del bazo de un animal inmunizado y de células del mieloma para producir un hibridoma. Los hibridomas pueden ser examinados para la producción del anticuerpo adecuado, luego cultivados y cosechados los anticuerpos. Como se utiliza en este documento, el término “células cultivadas” se refiere a los hibridomas o cualquier célula que produce anticuerpos. Los métodos para producir y examinar tales hibridomas están descritos en Harlow, *et al.*, *supra*. Los métodos para preparar un antígeno para que los anticuerpos producidos sean reactivados con la albúmina de los animales son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow, *et al.*, *supra*. La preparación del material antígeno para la inyección en el animal incluye cualquier técnica conocida en la materia, y incluyen, por ejemplo, la utilización de la proteína de larga duración, la utilización de péptidos seleccionados de las regiones inmunogénicas de la proteína, modificando el antígeno por métodos tales como, por ejemplo, acoplamiento dinitrofenol, acoplamiento arsynyl, la desnaturalización del antígeno, acoplamiento del antígeno a proteínas transportadoras tales como, por ejemplo, hemaocianina keyhole limpet, péptidos que contienen sitios de unión al receptor de la célula-T de clase-II, a los nódulos, y cualquier otro método conocido en la materia. Ver Harlow, *et al.*, *supra*.

Los anticuerpos anti-albúmina para su uso en la presente invención pueden incluir anticuerpos multifuncionales, por ejemplo un anticuerpo bifuncional que tiene al menos una porción funcional que se une de forma específica a la albúmina animal. Tales anticuerpos multifuncionales pueden incluir, por ejemplo, una molécula quimérica que comprende una porción de la molécula que se une a la albúmina animal y una segunda porción que permite a la molécula quimérica enlazarse a un sustrato o ser detectado de tal manera que la unión a la albúmina es irreprochable. Ejemplos de adecuadas segundas porciones incluyen pero no se limitan a un fragmento de una molécula inmunoglobulina, una proteína fluorescente o un enzima.

En adición a anticuerpos anti-albúmina, moléculas ligantes de albúmina pueden también incluir proteínas y péptidos que se unen a la albúmina. Tales proteínas y péptidos pueden ser de origen natural, recombinante o sintético y pueden o no ser purificadas. Ejemplos de proteínas no-anticuerpo, ligantes de albúmina, incluyen, pero no se limitan a, la proteína A de 42-kilodalton (kDa) de *Staphylococcus aureus*, la proteína G de *S. aureus* y *Escherichia coli*, la albúmina de rata 60-kDa ligante de proteína de (gp60) y la proteína renal humana cubilin túbulo. La utilización de homólogos funcionales de tales proteínas, de estas u otras especies, para la detección de la albúmina es también contemplada. Los híbridos o fusiones de las proteínas ligantes de albúmina que retienen su capacidad ligante de albúmina pueden también ser usados. En tales híbridos, la porción ligante de albúmina de la proteína podría ser unida a una segunda porción que permite al híbrido estar enlazado a un sustrato o ser detectado. Ejemplos de adecuadas porciones segunda incluyen, pero no se limitan a, un fragmento de una molécula inmunoglobulina, una etiqueta del epítipo, una proteína fluorescente o una enzima.

Una molécula ligante de albúmina para su uso en la presente invención puede estar contenida en una formulación. Por ejemplo, un anticuerpo puede combinarse con un amortiguador en el cual el anticuerpo se solubiliza, y/o con transportador. Adecuados amortiguadores y transportadores son conocidos por aquellos expertos en la materia. Ejemplos de adecuados amortiguadores incluyen cualquier amortiguador en el cual una molécula ligante de albúmina pueda funcionar para de forma selectiva se una a la albúmina, tales como, pero no limitados a, solución amortiguadora de fosfatos, agua, salina, amortiguador fosfato, amortiguador HEPES (N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-solución amortiguadora de ácido etansulfónico) amortiguador TES(Tris -solución amortiguadora EDTA), amortiguador Tris y amortiguador TAE (Tris-acetato-EDTA). Ejemplos de transportadores incluyen, pero no se limitan a, matrices poliméricas, toxoides y albúminas séricas, tales como la albúmina sérica bovina. Los transportadores pueden ser combinados con una molécula ligante de albúmina o conjugada (i.e. adjuntada) a una molécula ligante de albúmina de tal manera que no interfiera sustancialmente con la capacidad de la molécula ligante de albúmina para unirse de forma selectiva a la albúmina. En adición, adecuadas formulaciones de la presente invención pueden incluir no solo la molécula ligante de albúmina a la albúmina de especie específica, sino también a uno o más antígenos o anticuerpos adicionales útiles para la detección de la albúmina.

Como se utiliza en este documento, el término “contacto” se refiere a la introducción de una muestra que supelementalmente contiene albúmina a un compuesto ligante de albúmina, por ejemplo, mediante la combinación o mezcla de la muestra con el compuesto ligante de albúmina. Cuando la albúmina está presente en la muestra, un complejo de albúmina es formado; tal formación de complejo se refiere a la capacidad de un compuesto anti-albúmina unirse de forma selectiva a la albúmina con el fin de formar un complejo estable que puede ser detectado. La detección puede ser cualitativa, cuantitativa, o semi-cuantitativa. La unión de albúmina en la muestra al compuesto ligante de albúmina se lleva a cabo bajo condiciones adecuadas para formar un complejo. Tales condiciones (ej., concentraciones apropiadas, amortiguadores, temperaturas, tiempos de reacción) así como los métodos para optimizar tales

condiciones son conocidas por aquellos expertos en la materia. La unión puede ser medida utilizando una variedad de métodos estándar en la materia incluyendo, pero no limitado a, inmunoensayos enzimáticos (ej., ELISA), inmunoprecipitaciones, ensayos inmunoblot y otros inmunoensayos como se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *supra*, y Harlow, *et al.*, *supra*. Estas referencias también proporcionan ejemplos de condiciones de formación compleja.

En una realización, un complejo de compuesto ligante de albúmina/albúmina, también citado en este documento como un complejo de compuesto de albúmina, puede formarse en la solución. En otra realización, un complejo de compuesto ligante de albúmina/albúmina puede formarse en la que la albúmina o el compuesto ligante de albúmina es inmovilizado en (ej., recubriendo) un sustrato. Las técnicas de inmovilización son conocidas por aquellos expertos en la materia. Adecuados materiales sustrato incluyen, pero no se limitan a, plástico, vidrio, gel, celuloide, tela, papel, y las partículas materiales. Ejemplos de materiales sustrato incluyen, pero no se limitan a, látex, poliestireno, nylon, nitrocelulosa, azarosa, algodón, PVDF (poli-fluoruro de vinilideno) y resina magnética. Formas adecuadas para el material de sustrato incluyen, pero no se limitan a, un pozo (ej., pozo de plato microtulado), una placa de microtulación, una tira reactiva, una tira, un aparato de flujo lateral, una membrana, un filtro, un tubo, un plato, una matriz de tipo celuloide, una partícula magnética, y otras partículas. Particularmente sustratos preferidos incluyen, por ejemplo, una placa de ELISA, una tira reactiva, una tira inmunodot, una placa radioinmunoensayo, una tira de azarosa, una tira de plástico, una tira de látex, una esponja, un hilo de algodón, una ficha de plástico, una membrana inmunoblot, una papel inmunoblot y una membrana de flujo continuo. En una realización, un sustrato, tales como partículas, pueden incluir un marcador detectable. Para descripciones de ejemplos de materiales sustrato, ver, por ejemplo, Kemeny, D.M. (1991) *A Practical Guide to ELISA*, Pergamon Press, Elmsford, NY pp 33-44, y Price, C. y Newman, D. eds. *Principles and Practice of Immunoassay*, 2nd edition (1997) Stockton Press, NY, NY.

En una realización preferida, un compuesto anti-albúmina es inmovilizado sobre un sustrato, tales como un pozo de plato microtulado, una tira reactiva, una tira inmunodot, o un aparato de flujo lateral. Una muestra de orina recogida de un animal es aplicada al sustrato y incubado bajo condiciones adecuadas (i.e. suficiente) para permitir la formación de complejo de compuesto de albúmina anti-albúmina enlazado al sustrato (i.e. la albúmina en la muestra se une al compuesto anti-albúmina inmovilizado sobre el sustrato).

Según con la presente invención, una vez formada, una molécula ligante de albúmina/complejo albúmina es detectada. Como se utiliza en este documento, el termino "formación compleja de detección" se refiere a la identificación de la presencia del compuesto ligante de albúmina complejos con la albúmina. Si se forman complejos, la cantidad de complejos formados puede, pero no tiene por que ser cuantificado. La formación de complejo, o la unión selectiva, entre una composición de albúmina putativa con un compuesto ligante de albúmina pueden ser medidos (i.e. detectado, determinado) usando una variedad de métodos estándar en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook *et al. supra*), ejemplos de los cuales están descritos en este documento. Un complejo puede ser detectado en una variedad de formas incluyendo, pero no limitado al uso de uno o más de los siguientes ensayos: un inmunoensayo enzimático, un inmunoensayo competitivo ligado a enzimas, un radioinmunoensayo, un inmunoensayo fluorescente, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de flujo lateral, un ensayo de flujo continuo, un ensayo de aglutinación, un ensayo basado en partículas (ej., utilizando partículas tales como, pero no limitados a, partículas magnéticas o polímeros plásticos, como el látex o tiras de poliestireno), un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de BioCore™ (ej., utilizando oro coloidal) un ensayo inmunodot (ej., sistema inmunodot de CMG, Fribourg, Suiza), y un ensayo inmunoblot (ej., un western blot) un ensayo de fosforescencia, un ensayo de flujo continuo, un ensayo basado en partículas, un ensayo de cromatografía, un ensayo basado en PAGE, un ensayo de resonancia de plasmones de superficie, un ensayo espectrofotométrico y un ensayo sensorial electrónico. Tales ensayos son muy bien conocidos por aquellos expertos en la materia.

Los ensayos pueden ser utilizados para dar resultados cualitativos o cuantitativos dependiendo en como son utilizados. Los resultados de los ensayos pueden basarse en la detección de la molécula de albúmina en su totalidad o fragmentos, productos de degradación o productos de reacción de la albúmina. Algunos ensayos, como la aglutinación, separación de partícula, y inmunoprecipitación, pueden observarse de forma visual (ej., ya sea mediante el ojo o mediante una máquina, como un densitómetro o espectrofotómetro) sin la necesidad de un marcador detectable.

En otros ensayos, la conjugación (i.e., adjunto) de un marcador detectable al compuesto anti-albúmina o a un reactivo que se une selectivamente a las ayudas del compuesto anti-albúmina en la detección de formación de complejos. Un marcador detectable puede ser conjugado al compuesto anti-albúmina o reactivo en un sitio que no interfiera con la capacidad del compuesto anti-albúmina de unirse a la albúmina. Los métodos de conjugación son conocidos por aquellos expertos en la materia. Ejemplos de marcadores detectables incluyen, pero no se limitan a, una etiqueta radioactiva, una etiqueta fluorescente, una etiqueta quimioluminiscente, una etiqueta de cromóforos, una etiqueta de la enzima, una etiqueta fosforescente, una etiqueta electrónica; una etiqueta de metal sol, una tira de color, una etiqueta física, o un ligando. Un ligando se refiere a una molécula que se une selectivamente a otro molécula. Marcadores detectables preferidos incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, un radioisótopo, una fosfatasa (ej., fosfatasa alcalina), biotina, avidina, una peroxidasa (ej., peroxidasa de rabano), beta-galactosidasa, y compuestos relacionados con biotina o compuestos relacionados con avidina (ej., estreptavidina o InmunoPure® NeutrAvidin).

## ES 2 356 382 T3

En una realización, un complejo de compuesto albúmina animal puede detectarse mediante el contacto de una muestra con un anticuerpo compuesto específico conjugado a un marcador detectable. Un marcador detectable puede ser conjugado a un anticuerpo anti-albúmina u otro compuesto que se une al compuesto ligante de albúmina de tal manera que no bloquee la capacidad del anticuerpo anti-compuesto u otro compuesto para unirse al compuesto ligante de albúmina canino que es detectado. Marcadores detectables preferidos incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, un radioisótopo, una fosfatasa (ej., fosfatasa alcalina), biotina, avidina, una peroxidasa (ej., peroxidasa de rábano), beta-galactosidasa, y compuestos relacionados con la biotina o compuestos relacionados con la avidina (ej., estreptavidina o ImunoPure® NeutrAvidin).

En otra realización, un complejo es detectado mediante el contacto con el complejo con una molécula de indicador. Adecuadas moléculas indicador incluyen molécula que se pueden unir al complejo de molécula ligante de albúmina/albúmina o a la albúmina. Como tal, una molécula de indicador puede comprender, por ejemplo, un reactivo ligante de albúmina, como un anticuerpo. Moléculas indicador preferidas que son anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos reactivos con los anticuerpos de especies de animal en el que los anticuerpos anti-albúmina son producidos. Una molécula de indicador por si misma puede ser adjuntada a un marcador detectable para su utilización en la presente invención. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser conjugado a biotina, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o fluoresceína.

Uno o mas capas y/o tipos de moléculas secundarias o otras moléculas ligantes capaces de detectar la presencia de una molécula de indicador puede ser utilizada en la practica de la invención. Por ejemplo, un anticuerpo secundario sin etiquetar (i. e., no conjugado a un marcador detectable) que selectivamente se une a una molécula de indicador puede ser enlazada a un anticuerpo terciario etiquetado (i.e., conjugado a un marcador detectable) que selectivamente se une a un anticuerpo secundario. Adecuados anticuerpos secundarios, anticuerpos terciarios y otras moléculas secundarias o terciarias pueden ser fácilmente seleccionados por aquellos expertos en la materia. Moléculas terciarias preferidas pueden también ser seleccionadas por aquellos expertos en la materia basados en las características de la molécula secundaria. La misma estrategia puede ser aplicada para las capas posteriores.

Preferiblemente, la molécula de indicador es conjugada a un marcador detectable. Un agente de desarrollo se añade, si se requiere, y el sustrato es sometido a un dispositivo de detección para el análisis. En algunos protocolos, procesos de lavado se agregan después de uno o ambos pasos de formación de complejos con el fin de eliminar los reactivos en exceso. Si tales pasos son usados, envuelven condiciones conocidas por aquellos expertos en la materia de modo el exceso de reactivos es eliminado pero el complejo se conserva.

Una realización para la detección de microalbuminuria implica el uso de un ensayo de flujo lateral, ejemplos de los cuales están descritos en la Patente U.S. No. 5,424,193, publicado el 13 de junio de 1995, por Pronovost *et al.*; Patente U.S. No. 5,415,994, publicado el 16 de mayo de 1995, por Imrich *et al.*; WO94/29696, publicado el 22 de diciembre de 1994, por Millar *et al.*; y WO94/01775, publicado el 20 de enero de 1994, por Pawlak *et al.* Un ensayo de flujo lateral es un ejemplo de un ensayo de un solo paso. En un ensayo de un solo paso, una vez que la muestra se ha obtenido y preparado para la prueba, solo una única acción es necesaria por parte del usuario para detectar la presencia de un analito. Por ejemplo, la muestra, en su totalidad o en parte, puede ser aplicada a un dispositivo que luego mide el analito en la muestra. En una realización, una muestra es colocada en un aparato de flujo lateral que incluye los siguientes componentes: (a) una estructura de apoyo definiendo una trayectoria de flujo; (b) un reactivo etiquetado que comprende una tira conjugada a un anticuerpo específico, el reactivo etiquetado siendo impregnado dentro de la estructura de apoyo en una zona etiquetada; y (c) un reactivo de captura. Anticuerpos preferidos incluyen aquellos descritos en este documento. El reactivo de captura esta localizado en una dirección descendente del reactivo etiquetado dentro de una zona de captura fluidamente conectado a la zona de etiquetado de tal manera que el reactivo etiquetado puede fluir desde la zona etiquetada dentro de la zona de captura. La estructura de soporte comprende un material que no impide el flujo de las tiras de la zona etiquetada a la zona de captura. Materiales adecuados para la utilización como una estructura de apoyo incluyen material iónico (i.e., aniónicos o catiónicos). Ejemplo de este tipo de material incluyen, pero no se limitan a, nitrocelulosa, PVDF, o carboximetilcelulosa. La estructura de apoyo define una trayectoria de flujo que es lateral y es dividido en zonas, llamados una zona de etiquetado y una zona de captura. El aparato puede también incluir una zona receptora de muestra localizada junto a la trayectoria de flujo, preferiblemente en dirección ascendente del reactivo etiquetado. La trayectoria de flujo en la estructura de apoyo es creado mediante el contacto de una porción de la estructura de apoyo en dirección descendente de la zona de captura, preferible en el extremo de la trayectoria de flujo, a un absorbente capaz de absorber excesos de líquido de las zonas de etiquetado y de captura.

En otra realización, un aparato flujo lateral utilizado para detectar albúmina incluye: (a) una estructura de apoyo definiendo una trayectoria de flujo; (b) un reactivo etiquetado que comprende un anticuerpo anti-albúmina como se describe arriba, el reactivo etiquetado impregnado dentro de la estructura de apoyo en una zona etiquetada; y (c) un reactivo de captura, el reactivo de captura siendo localizado en dirección descendente del reactivo etiquetado dentro de una zona de captura fluidamente conectada a la zona etiquetada de tal manera que el reactivo etiquetado pueda fluir de la zona etiquetada en la zona de captura. El aparato de preferencia también incluye un absorbente localizado en el extremo de la trayectoria de flujo. Una realización preferida incluye un reactivo de captura que comprende un anticuerpo albúmina anti-canino.

## ES 2 356 382 T3

Una vez que el nivel de albúmina ha sido medido, una evaluación de si la enfermedad renal temprana esta presente puede luego hacerse. Evaluando la presencia de la enfermedad renal temprana significa comparar el nivel de albúmina en la muestra al nivel encontrado en animales saludables. La presencia de microalbuminuria en la muestra, en ausencias de cambio en la función renal, es un indicativo de la enfermedad renal temprana. Como se utiliza en este documento, el término “indicativo de la enfermedad renal temprana” significa que suficiente disfunción glomerular esta presente para permitir a la albúmina pasar en la orina en el rango de unos 10  $\mu\text{g/ml}$  a unos 300  $\mu\text{g/ml}$ . La cantidad de albúmina presente en la muestra puede variar dependiendo en la cantidad de daño presente pero en la enfermedad renal presente, el nivel de albúmina es mayor a la observada en animales sanos pero menor a la detectable mediante métodos actuales utilizados para medir la proteinuria. En la presente invención, una determinación de la enfermedad renal temprana se hace cuando el nivel de albúmina en la muestra es determinada para estar en el rango de unos 10  $\mu\text{g/ml}$  a unos 300  $\mu\text{g/ml}$ . El rango superior de los niveles de albúmina puede también ser de unos 25  $\mu\text{g/ml}$ , unos 50  $\mu\text{g/ml}$ , unos 75  $\mu\text{g/ml}$ , unos 100  $\mu\text{g/ml}$ , unos 125  $\mu\text{g/ml}$ , unos 150  $\mu\text{g/ml}$  unos 175  $\mu\text{g/ml}$ , unos 200  $\mu\text{g/ml}$ , unos 225  $\mu\text{g/ml}$ , unos 250  $\mu\text{g/ml}$ , unos 275  $\mu\text{g/ml}$ , o unos 300  $\mu\text{g/ml}$ . El nivel de albúmina en la muestra puede variar dependiendo en la severidad del daño al riñón. Realizaciones preferidas de la presente invención pueden detectar la albúmina cuando se pierde alrededor del 10%, alrededor del 20%, alrededor del 30%, alrededor del 40%, alrededor del 50%, alrededor del 60%, alrededor del 70%, alrededor del 80%, o alrededor del 90% de la función del riñón. Una realización mas preferida puede detectar la microalbuminuria a tiempo para la intervención médica lo cual puede retardar o prevenir el inicio de la última etapa de la enfermedad renal. Tal intervención puede, por ejemplo, incluir, pero no se limita al uso de compuestos farmacológicos o modificaciones dietéticas para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad renal.

Una realización de la presente invención hace uso de un dispositivo de “tira reactiva” el cual puede detectar la microalbuminuria en los animales. Las tiras reactivas pueden construirse en una variedad de formas que dependen en parte del modo en que se van a utilizar. Pueden ser sujetados directamente en una muestra (ej., un chorro de orina), sumergido directamente en una muestra contenida en un recipiente de colección, o tienen la muestra aplicada a una tira contenida en una cinta de plástico o plataforma. Otro ejemplo de una tira reactiva es un dispositivo de “flujo continuo”, un ejemplo de que es un sistema de inmunoanálisis heterogéneo basado en un anticuerpo de captura inmovilizado sobre una membrana adjunta a un depósito absorbente. Una “tira” se refiere a un sustrato en particular compuesto de una matriz como el látex o poliestireno, que pueden ser enlaces cruzados covalentes o no covalentes a una molécula de detección. Una realización preferida del ensayo de “tira reactiva” es un sistema inmunométrico descrito en la Patente U.S. No. 5,656,502, publicado el 12 de agosto de 1997, a MacKay y Fredrickson, y la Patente U.S. No. 6,001,658, publicado el 14 de diciembre de 1999 a Fredrickson. Particularmente preferido es un dispositivo ImmunoDip<sup>TM</sup> disponible de Diagnostic Chemicals Ltd., PEI, CA.

Métodos no inmunológicos también pueden ser utilizados. Con el fin de detectar la microalbuminuria, métodos tales como la preconcentración de la orina con el fin de concentrar la albúmina puede ser utilizado para aumentar la sensibilidad de la prueba a la proteína. Tales métodos no inmunológicos incluyen, por ejemplo, electroforesis de orina, donde la detección de la microalbuminuria puede ser determinado por métodos conocidos en la materia, y incluyen, por ejemplo, tinción de proteínas. En otra realización, una proteína basado en la prueba de albúmina puede ser utilizado para determinar la microalbuminuria en una mezcla pre-concentrada de orina de un animal.

Los métodos de la presente invención pueden ser utilizados para detectar la nefropatía en un cánido, férido o équido, particularmente cuando la nefropatía es glomerulonefropatía, y especialmente glomerulonefritis. Mas específicamente, la medición de la microalbuminuria se correlaciona a la presencia de la enfermedad renal temprana en un animal de destino. Como se utiliza en este documento, el termino “nefropatía” y/o “enfermedad renal” se refiere a cualquier enfermedad de los riñones, y pueden incluir, por ejemplo, nefritis de los tejidos renales glomerulares, tubulares, o intersticiales.

Tal nefropatía de fase temprana puede resultar de muchas causas diferentes, incluyendo, por ejemplo, alergia, cáncer, infección parasitaria, viral, o bacteriana de cualquier tejido en el animal, exposición a toxinas renales, enfermedades autoinmunes, tales como el lupus eritematoso sistémico y vasculitis, tumores malignos, raticidas vitamina D3, pielonefritis, la leptospirosis, la obstrucción del tracto urinario, enfermedad inflamatoria crónica, pioderma, pancreatitis, prostatitis, enfermedades autoinmunes, enfermedad dental, presión arterial alta, o diabetes. Como se utiliza en este documento, un “agente infeccioso” es uno que infecta animales e incluye, pero no se limitan a, virus, bacterias, hongos, endoparásitos y ectoparásitos. Ejemplos de agentes virales infecciosos incluyen, pero no se limitan a, adenovirus, calicivirus, coronavirus, virus del distemper, virus de la hepatitis, herpesvirus, virus de inmunodeficiencia, peritonitis infecciosa virus, los virus de la leucemia, el virus oncogénicos, los virus del papiloma, virus parainfluenza, parvovirus, virus de la rabia, y reovirus, así como otras que causan cáncer o virus relacionados con el cáncer. Ejemplos de agentes bacterianas infecciosas incluyen, pero no se limitan a, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Dermatophilus*, *Ehrlichia*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Haemobartonella*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *L-form bacteria*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycobacteria*, *Mycoplasma*, *Neorickettsia*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Rochalimaea*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Yersinia*. Ejemplos de agentes infecciosos fungicidas incluyen, pero no se limitan a, *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Basidiobolus*, *Bipolaris*, *Blastomyces*, *Candida*, *Chlamydia*, *Coccidioides*, *Conidiobolus*, *Cryptococcus*, *Curvularia*, *Epidermophyton*, *Exophiala*, *Geotrichum*, *Histoplasma*, *Madurella*, *Malassezia*, *Microsporium*, *Moniliella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialemonium*, *Phialophora*, *Prototheca*, *Pseudallescheria*,

*Pseudomicrodochium, Pythium, Rhinosporidium, Rhizopus, Scoleobasidium, Sporothrix, Stemphylium, Trichophyton, Trichosporon, y Xylohypha.* Ejemplos de agentes infecciosos de parásitos protozoarios incluyen, pero no se limitan a, *Babesia, Balantidium, Besnoitia, Cryptosporidium, Eimeria, Encephalitozoon, Entamoeba, Giardia, Hammondia, Hepatozoon, Isospora, Leishmania, Microsporidia, Neospora, Nosema, Pentatrachomonas, Plasmodium, Pneumocystis, Sarcocystis, Schistosoma, Theileria, Toxoplasma, y Trypanosoma.* Ejemplos de agentes infecciosos de parásitos helminto incluyen, pero no se limitan a, *Acanthocheilonema, Aelurostrongylus, Ancylostoma, Angiostrongylus, Ascaris, Brugia, Bunostomum, Capillaria, Chabertia, Cooperia, Crenosoma, Dictyocaulus, Dioctophyme, Dipetalonema, Diphyllbothrium, Diplydium, Dirofilaria, Dracunculus, Enterobius, Filaroides, Haemonchus, Lagochilascaris, Loa, Mansonella, Muellerius, Nanophyetus, Necator, Nematodirus, Oesophagostomum, Onchocerca, Opisthorchis, Osteragia, Parafilaria, Paragonimus, Parascaris, Physaloptera, Protostrongylus, Setaria, Spirocerca, Spirometra, Stephanofilaria, Strongyloides, Strongylus, Thelazia, Toxascaris, Toxocara, Trichinella, Trichostrongylus, Trichuris. Uncinaria, y Wuchereria.* Ejemplos de agentes infecciosos de ectoparásitos incluyen, pero no se limitan a, pulgas, garrapatas, incluyendo las garrapatas duras y las garrapatas, moscas como la cecidomia, mosquitos, moscas de la arena, moscas negras, tábanos, moscas de los cuernos, moscas del venado, moscas tse-tse, la mosca del establo, moscas que causan miasis y mosquitos picadores, hormigas, arañas, piojos, ácaros, y chinches, como los insectos de la cama y insectos besadores.

La presente invención puede también incluir la medición de múltiples analitos. Otros analitos pueden ser cualquier analito que puede ser detectado en una muestra adecuada para el uso en la detección de la enfermedad renal temprana. Analitos adicionales pueden ser utilizados para detectar, por ejemplo, enfermedades infecciosas o errores innatos del metabolismo.

La presente invención hace uso de los anticuerpos que se unen a la albúmina de un animal siendo tratado. Un anticuerpo preferido es uno que detecta los niveles de albúmina cuando la cantidad en la muestra es unos 50  $\mu\text{g/ml}$ , mas preferible 25  $\mu\text{g/ml}$ , mas preferible 10  $\mu\text{g/ml}$ . Otro anticuerpo preferido es una que detecta los niveles de albúmina cuando la cantidad en la muestra es unos 50  $\mu\text{g/ml}$ , mas preferible unos 25  $\mu\text{g/ml}$ , mas preferible unos 10  $\mu\text{g/ml}$  y el método de detección es un dispositivo de tira reactiva descrita en la Patente U.S. No. 6,001,658. Un anticuerpo preferido es uno que compite con cualquiera de los anticuerpos monoclonales TNB1, TNB3, TNB4, TNB5, TNB6, H352, H386, H387, H388, H389, H390, H391, H393, H394, H395, H396, H397, H398, H399, H400, H401, o H402 para la unión selectiva a la albúmina animal, preferiblemente albúmina canina. Otra realización preferida es un anticuerpo que se une al epítipo mismo o relacionado, como la definición de homología de secuencia, enlazado por los anticuerpos TNB3, TNB6 y H402. Un anticuerpo preferido es seleccionado del grupo consistente de TNB1, TNB3, TNB4, TNB5, TNB6, H352, H386, H387, H388, H389, H390, H391, H393, H394, H395, H396, H397, H398, H399, H400, H401, y H402. Mas preferido es un anticuerpo seleccionado del grupo consistente de TNB3, TNB6 y H402. Como se utiliza en este documento, los términos “compite” y “inhibir la unión selectiva” se refiere a la capacidad de un anticuerpo de prevenir a otro anticuerpo unirse a la misma proteína como se describe en los ejemplos incluidos.

La presente invención puede hacer uso de kits adecuados para la detección de albúmina animal utilizando los métodos descritos en este documento. Medios adecuados de detección incluyen las técnicas descritas en este documento, utilizando compuestos que unen la albúmina animal deseada, tales como, por ejemplo, un anticuerpo anti-albúmina. Como tal, un kit puede también comprender un marcador detectable, como un anticuerpo que selectivamente se une al compuesto ligante de albúmina u otras moléculas de indicador. El kit también puede contener componentes asociados, tales como, pero no limitados a, amortiguadores, etiquetas, recipientes, insertos, tubos, viales jeringas y similares.

La presente invención esta basada en un descubrimiento sorprendente de que la microalbuminuria en cánidos puede utilizarse como un marcador para predecir el desarrollo de la enfermedad renal en perros no diabéticos así como en perros diabéticos dado que la microalbuminuria no tiene claramente valor predictivo en pacientes no diabéticos humanos. Usos similares están contemplados en otros animales como se afirma. Sin embargo, a pesar de este sorprendente descubrimiento, hasta la presente invención, no existían métodos efectivos para detectar la microralbuminuria en perros. Métodos convencionales para la detección de la microalbuminuria humana no detectan la microalbuminuria en los perros como se describe en los ejemplos a continuación.

Se proporcionan los siguientes ejemplos con el propósito de ilustrar y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención.

#### Ejemplo 1

##### *Medición de la Microalbuminuria en Perros CRF y ARF Normales*

Se recogieron muestras de orina de 134 pacientes caninos en el Hospital Universitario de Enseñanza del Estado de Colorado. Estas muestras incluyen orina de perros normales, perros que sufren insuficiencia renal crónica, perros que sufre insuficiencia renal aguda, y perros proteinuricos sin insuficiencia renal. Las muestras se enfriaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos 24 horas y luego se descongelaron antes de su uso. Los niveles de albúmina fueron cuantificados mediante un ensayo de inmunodifusión microradial como se describe en McDonald, Weber & Thiele, “Construction and Use of a Template Block for Radial Immunodiffusion” Anal Biochem 186:165-168 (1990) usando un anticuerpo

## ES 2 356 382 T3

anti-albúmina comercial (albúmina policlonal de conejo anti-perro, disponible de Nordic Immunology distribuido por Accurate Chemical y Scientific Corp., Westbury, N.Y.). Para este ensayo el anticuerpo en el 1.5% (vol/vol) se añadió a agarosa derretida 0.75% (v/v) de EEO en PBS. Geles, con un grosor de 0.75 mm se vierten entre dos placas de vidrio. Los geles se dejan solidificar y después de que uno de las placas de vidrio es removido, se deja secar un poco. Bloques acrílicos, descritos en McDonald *et al.*, *supra.*, fueron incluidos en la agarosa y 5  $\mu$ l de la muestra o estándar se colocó en cada pocillo del bloque acrílico. Las muestras fueron ejecutadas ya sea sin diluir o si el anillo resultante fue muy grande para medir la muestra fue diluida y analizada de nuevo. La curva estándar que usa albúmina de perro (fracción V de albúmina de perro, disponible de Sigma, St. Louis, MO) fue lineal dentro del rango de 10 - 100  $\mu$ g/ml. Los bloques acrílicos se dejaron en la agarosa y la unidad fue colocada en una cámara húmeda e incubada durante la noche a temperatura ambiente. Los geles de agarosa fueron luego remojadas en agua destilada durante varias horas para eliminar el exceso de proteína del gel, el gel fue secado y luego teñido con Coomassie Brilliant Blue de modo que los anillos de precipitación podían ser fácilmente visualizados. El diámetro de cada anillo fue medido y el diámetro del anillo de cada muestra se comparó a la curva estándar y la concentración de albúmina de cada muestra fue calculada.

La ventaja de usar este sistema para la medición de la albúmina en la orina es que este sistema es mas sensible que el ensayo tradicional con pocillos cortados en los geles. Esta sensibilidad aumentada es relacionada al suministro concentrado del antígeno en un área pequeña en lugar del área de superficie mayor creada por los bordes de un pocillo cortado en la agarosa. Para este estudio inicial, las muestra que tenían menos de o igual a 50  $\mu$ g/ml se considero normal, las muestras que tenían niveles entre 51 y 300  $\mu$ g/mu se considero microalbuminuria, y aquellas que tenían niveles sobre 300  $\mu$ g/mu se considero macroalbuminuria. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

*Niveles de albúmina urinaria en 134 muestras de orina canina*

| <b>Nivel de Albúmina</b>                               | <b>Numero de Animales</b> | <b>Porcentaje</b> |
|--|---------------------------|-------------------|
| <b>Normal (0-50 <math>\mu</math>g/ml)</b>              | <b>59</b>                 | <b>44%</b>        |
| <b>Microalbuminuria (51-300 <math>\mu</math>g/ml)</b>  | <b>21</b>                 | <b>16%</b>        |
| <b>Macroalbuminuria (&gt;300 <math>\mu</math>g/ml)</b> | <b>54</b>                 | <b>40%</b>        |

### Ejemplo 2

#### *La Cuantificación de Microalbuminuria ELISA*

El suero de albúmina de conejo anti-canino IgG (anti-CSA IgG) es diluido a 375 ng/ml en un amortiguador de recubrimiento (50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaCHO}_3$ , pH 9.6). La solución anti-CSA IgG diluida es añadida a una placa de MaxiSorp™ C8 Break-apart Microwells (Nunc Cat. # 473768) a 100  $\mu$ l/pocillo, cubierto y incubado durante la noche (16 a 24 horas) a 4°C. La placa es lavada cuatro veces con amortiguador fosfato salino con 0.05% de Tween 20 (PBS-T) en un lavador de placas automático y borrado en seco. Un amortiguador de bloqueo (StabilCoat™ disponible de Surmodics Cat. #SC01-1000) es añadido a 200  $\mu$ l/pocillo, cubierto y incubado a temperatura ambiente durante al menos 1 hora.

Mientras se bloquea, la serie de diluciones del suero de albúmina canino (CSA) es preparado. Primero el CSA es diluido a 120 ng/ml en un diluyente de ensayo (0.1% hidrolizado de caseína en PBS-T). Esta solución es diluida en serie (1 parte a 1 parte) para hacer 60 ng/ml, 30 ng/ml, 7.5 ng/ml, 3.75 ng/ml, y 1.875 ng/ml. Los 5 últimos estándares se utilizan para la curva estándar (30 ng/ml y menos) junto con un "cero" estándar (diluyente de ensayo sin CSA). Cada muestra de orina a ser probada es diluida 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 y 1/32000 en un diluyente de ensayo.

La placa es lavada cuatro veces en un lavador de placas automático y dejado a secar. El CSA estándar y la muestra de orina diluida son añadidos a 100  $\mu$ l/pocillo de cada uno de los pocillos de prueba. El diluyente de ensayo es añadido para duplicar los pocillos para el control de bases. La placa es cubierta y incubada durante 2 horas a temperatura ambiente. Como anteriormente, la placa es lavada cuatro veces con PBS-T y se deja secar.

Diluir biotina etiquetada de cabra anti-CSA IgG (Laboratorios Bethyl, Cat. #E40-113) a 125 ng/ml en diluyente de ensayo. Agregar 100  $\mu$ l/pocillo de biotina etiquetada diluida de cabra anti-CSA IgG a todos los pocillos de prueba. Cubrir la placa e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como anteriormente, lavar la placa cuatro veces con PBS-T y dejar secar.

## ES 2 356 382 T3

Diluir peroxidasa de rábano estreptavidina etiquetada (KPL Cat.# 14-30-00) a 500 ng/ml (1/1000 de dilución) en diluyente de ensayo y agregar a todos los pocillos de muestra a 100 µl/pocillo. Cubrir e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Como anteriormente, lavar la placa cuatro veces con PBS-T y dejar secar.

- 5 Mezclar las soluciones de sistema de componente TMB micropocillos peroxidasa 2 (KPL Cat.#50-76-03) juntas a volúmenes iguales y agregar 100 µl/pocillo de la mezcla TMB a todos los pocillos. Cubrir e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene añadiendo 100 µl/pocillo de solución de parada (1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) directamente a la TMB en cada pocillo. Lea los pocillos a 450 nm en un espectrofotómetro. Promediar los valores de los pocillos duplicados, si hubiera, y sustraer el valor base de todos los valores de prueba. Generar una curva estándar de los valores estándares y generar una línea de regresión ( $r^2 > 0.95$ ). Usando la fórmula de regresión, calcular el valor CSA (ng/ml) para cada muestra y multiplicar este valor por el factor de dilución. Solo aquellos valores que caen en la porción lineal de la curva estándar pueden ser usados.

### 15 Ejemplo 3

#### *Uso de la tira ImmunoDip™ para la Detección de Microalbuminuria en la Orina Canina*

- 20 Tres tiras ImmunoDip™ (numero de producto 700-01) para la detección de microalbuminuria en seres humanos, se obtuvieron de Diagnostic Chemicals Limited, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. Dos muestras de orina canina (numerado 1086 y 1098) se seleccionaron de un grupo de muestras obtenidas de perros en el Hospital Veterinario de Enseñanza Universitaria del Estado de Colorado, Fort Collins, Colorado. Las muestras 1086 y 1098 se seleccionaron basados en sus niveles de albúmina según lo determinado por un ELISA interno para detectar la microalbuminuria en perros. La muestra 1086 fue una muestra negativa, y la muestra 1098 tuvo una concentración de albúmina de 221 µg/ml. Para un control positivo, aproximadamente un 50 µl de sangre humana se añadió a 5 ml de agua desionizada.

- 30 La medición de la albúmina en la orina se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, 3 ml de orina o de agua enriquecida de sangre se añadió a un tubo de ensayo. La tira ImmunoDip se retiró de la bolsa y se colocó en el tubo de ensayo que contiene la orina asegurándose que el nivel de líquido estaba por encima del orificio de ventilación en el dispositivo. El dispositivo fue dejado en la muestra durante un mínimo de 3 minutos después tras lo cual fue removido y leído por la comparación de intensidades relativas de las dos bandas según el inserto de interpretación de resultados que acompaña al kit de prueba. Los resultados de ELISA interior y de las pruebas ImmunoDip se muestran en la Tabla 2.

35

TABLA 2

#### *Tira ImmunoDip™ para resultados de Microalbuminuria*

40

| <b>Muestra</b>                    | <b>ELISA Domestico</b> | <b>ImmunoDip</b> |
|-----------------------------------|------------------------|------------------|
| <b>1086</b>                       | <b>0 µg/ml</b>         | <b>Negativo</b>  |
| <b>1098</b>                       | <b>221 µg/ml</b>       | <b>Negativo</b>  |
| <b>Agua Enriquecida en Sangre</b> | <b>No Probado</b>      | <b>Positivo</b>  |

45

- 50 El límite de detección en la prueba de ImmunoDip para la albúmina de orina humana es 12 µg/ml. La muestra 1098 que contiene orina canina a un nivel significativamente por encima de este límite inferior pero fue negativo para la albúmina por la prueba de ImmunoDip™. Estos datos sugieren que este dispositivo no reconoce la albúmina canina, al menos no con el fin de detectar la microalbuminuria.

55

### Ejemplo 4

#### *Uso de Tiras de Prueba Micral® para la Detección de Microalbuminuria en Orina Canina*

- 60 Catorce tiras de prueba de orina Micral® (numero de producto 417146) para la detección de microalbuminuria en seres humanos, se obtuvieron de Roche BMC, Indianapolis, Indiana. Trece muestras de orina canina se seleccionaron del grupo de muestras obtenidas de perros de empleados. Las muestras para el uso se seleccionaron basadas en sus niveles de albúmina como se determina por un ELISA domestico para detectar la microalbuminuria en perros. Las muestras 2A, 4A & 16 A fueron muestras negativas mientras que las muestras sobrantes tenían concentraciones de albúmina que van en valor de 31.3 a >650 µg/ml. Como un control positivo, 50 µl de sangre humana se añadió a 5 ml de agua desionizada.

65

## ES 2 356 382 T3

La medición de la albúmina en la orina se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, cada orina de perro fue recogida en un recipiente de recogida de muestras. En adición, el agua enriquecida en sangre fue colocada en un tubo de ensayo. La tira Micral® fue retirado del vial y colocado en el recipiente de recogida (o tubo de ensayo que contiene agua enriquecida en sangre) asegurándose que el nivel del líquido estaba por encima de los dispositivos de dos líneas en cada caso. El dispositivo fue dejado en una muestra durante 5 segundos, retirado y dejado a reposar horizontalmente durante 1 minuto. El resultado se determinó comparando el color del bloc de prueba a la escala de color en la vial según el inserto resultante que acompaña la prueba. Los resultados del ELISA doméstico y de la prueba Micral® se muestran en la Tabla 3.

El límite de detección en la prueba Micral® para la albúmina humana es de unos 20 µg/ml. Varias muestras con contenido de niveles de albúmina canina significativamente por encima del límite inferior pero fueron negativos para la albúmina por la prueba Micral®. Estos datos sugieren que este dispositivo no reconoce la albúmina de orina canina, al menos no con el fin de detectar la microalbuminuria.

TABLA 3

*Resultados de la prueba de orina de la tira Micral®*

| <b>Muestra</b>         | <b>ELISA Domestico</b> | <b>Micral®</b>  |
|------------------------|------------------------|-----------------|
| <b>1A</b>              | <b>79.4 µg/ml</b>      | <b>Negativo</b> |
| <b>2A</b>              | <b>3.9 µg/ml</b>       | <b>Negativo</b> |
| <b>4A</b>              | <b>5.9 µg/ml</b>       | <b>Negativo</b> |
| <b>5A</b>              | <b>35.9 µg/ml</b>      | <b>Negativo</b> |
| <b>9A</b>              | <b>48.6 µg/ml</b>      | <b>Negativo</b> |
| <b>15A</b>             | <b>69.4 µg/ml</b>      | <b>Negativo</b> |
| <b>16A</b>             | <b>8.3 µg/ml</b>       | <b>Negativo</b> |
| <b>29A</b>             | <b>119.1 µg/ml</b>     | <b>Negativo</b> |
| <b>86A</b>             | <b>31.3 µg/ml</b>      | <b>Negativo</b> |
| <b>87A</b>             | <b>65.2 µg/ml</b>      | <b>Negativo</b> |
| <b>14</b>              | <b>&gt;650 µg/ml</b>   | <b>Negativo</b> |
| <b>19</b>              | <b>Positivo</b>        | <b>Negativo</b> |
| <b>45</b>              | <b>650 µg/ml</b>       | <b>Negativo</b> |
| <b>Agua Enri. San.</b> | <b>Sin probar</b>      | <b>Positivo</b> |

Ejemplo 5

*Uso de la tira ImmunoDip™ para la Detección de Microalbuminuria en Orina Canina*

Catorce tiras ImmunoDip™ (numero de producto 700-01) para la detección de microalbuminuria en seres humanos, se obtuvieron de Diagnostic Chemicals Limited, Charlottetown, PE, Canadá. Trece muestras de orina canina fueron seleccionadas del grupo de muestras obtenidas de perros que estaban aparentemente normal. Las muestras para el uso se seleccionaron basados en sus niveles de albúmina como se determinó por un ELISA doméstico para detectar la microalbuminuria en perros. Las muestras 2Ax, 4AA & 16AA fueron muestras negativas mientras que las muestras sobrantes tenían concentraciones de albúmina que van en valor de 31.3 a >650 µg/ml. Como un control positivo, 50 µl de sangre humana se añadió a 5 ml de agua desionizada.

La medición de la albúmina en la orina se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. En pocas palabras, 3ml de orina o el agua enriquecida con sangre se añadió a un tubo de ensayo. La tira ImmunoDip fue retirada de la bolsa y colocado en el tubo de ensayo que contiene la orina asegurándose que el nivel líquido estaba por encima del orificio de ventilación del dispositivo en cada caso. El dispositivo fue dejado en la muestra por un mínimo de 3 minutos tras lo cual, fue retirado y leído por la comparación de las intensidades relativas de las dos bandas según el inserto de interpretación de resultados que acompaña el kit de prueba. Los resultados de las pruebas del ELISA doméstico y el ImmunoDip se muestran en la Tabla 4.

## ES 2 356 382 T3

TABLA 4

*La tira ImmunoDip™ para resultados de Microalbuminuria*

| <b>Muestra</b>         | <b>ELISA Domestico</b> | <b>ImmunoDip™</b> |
|------------------------|------------------------|-------------------|
| 1A                     | 79.4 µg/ml             | Negativo          |
| 2A                     | 3.9 µg/ml              | Negativo          |
| 4A                     | 5.9 µg/ml              | Negativo          |
| 5A                     | 35.9 µg/ml             | Negativo          |
| 9A                     | 48.6 µg/ml             | Negativo          |
| 15A                    | 69.4 µg/ml             | Negativo          |
| 16A                    | 8.3 µg/ml              | Negativo          |
| 29A                    | 119.1 µg/ml            | Negativo          |
| 86A                    | 31.3 µg/ml             | Negativo          |
| 87A                    | 65.2 µg/ml             | Negativo          |
| 14                     | >650 µg/ml             | Negativo          |
| 19                     | Positivo               | Negativo          |
| 45                     | 650 µg/ml              | Negativo          |
| <b>Agua Enri. San.</b> | <b>Sin probar</b>      | <b>Positivo</b>   |

El límite de detección en la prueba ImmunoDip™ para la albúmina humana es de unas 20 µg/ml. Varias muestras con contenido de niveles de albúmina canina significativamente por encima del límite inferior pero fueron negativos para la albúmina por la prueba ImmunoDip™. Estos datos sugieren que este dispositivo no reconoce la albúmina de orina canina, al menos no con el fin de detectar la microalbuminuria.

### Ejemplo 6

*Uso de Tiras de Prueba Micral® para la Detección de Microalbuminuria en Orina Canina*

Cinco tiras de prueba de orina Micral® (numero de producto 417146) para la detección de microalbuminuria en seres humanos se obtuvieron de BMC, Indianápolis, Indiana. Trece muestra de orina canina se seleccionaron de un grupo de muestras obtenidas de perros que estaban aparentemente normal. Las muestras para su uso fueron seleccionados basados en sus niveles de albúmina como se determino por un ELISA domestico para detectar microalbuminuria en perros. Las muestras 7 y 12 fueron muestras negativas mientras que las muestras 14 y 25 tenían niveles de albúmina de 621 µg/ml y >650 µg/ml, respectivamente. Como un control positivo, 50 µl de sangre humana se añadió a 5 ml de agua desionizada.

La medición de albúmina en la orina se realizo siguiendo las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, cada orina de perro fue recogida en una recipiente de recogida de muestra. Para el control positivo, el agua enriquecida en sangre se coloco en un tubo de ensayo. La tira Micral® fue retirada de la vial y colocada en el recipiente de recogida (o tubo de ensayo que contiene el agua enriquecida en sangre) asegurándose que el nivel de liquido estaba por encima de los dispositivos dos líneas negras en cada caso. El dispositivo fue dejado en una muestra durante 5 segundos, retirado y dejado a reposar horizontalmente durante 1 minuto. El resultado se determino comparando el color de la carpeta de prueba a la escala de color n la vial según el resultado inserte que acompaño a la prueba. Los resultados del ELISA domestico y de la prueba Micral® se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

*Resultados de la tira de prueba de orina Miscral®*

| <b>Muestra</b>                    | <b>ELISA Domestico</b> | <b>Micral®</b>  |
|-----------------------------------|------------------------|-----------------|
| 7                                 | 2.1 µg/ml              | Negativo        |
| 12                                | 0.8 µg/ml              | Negativo        |
| 14                                | 621 µg/ml              | Negativo        |
| 25                                | >650 µg/ml             | Negativo        |
| <b>Agua Enriquecida en Sangre</b> | <b>No Probado</b>      | <b>Positivo</b> |

## ES 2 356 382 T3

El límite de detección en la prueba Micral® para la albúmina de orina humana es de unas 20 µg/ml. Las muestras 14 y 25 que contienen niveles de albúmina canina significativamente por encima de estos niveles inferiores pero fueron negativos para la albúmina por la prueba Micral®. Estos datos sugieren que este dispositivo reconoce la albúmina de orina canina, al menos no con el fin de detectar microalbuminuria.

### 5 Ejemplo 7

#### *Prevalencia de Microalbuminuria en Perros*

10 Para este estudio, dos poblaciones separadas fueron examinadas. Una muestra de la población se deriva de perros clínicamente normales (n=86). La segunda muestra de población se deriva de pacientes del Hospital de Enseñanza Universitario del Estado de Colorado (n=150) presentados para evaluaciones de salud de rutina, procedimientos electivos, así como la evaluación de problemas de salud. La microalbuminuria fue cuantificada usando un ELISA de captura de antígeno. Los resultados de esta medición se normalizaron a un peso específico de 1.010 para dar cuenta de distintas 15 concentraciones en orina. La albúmina en la orina de los pacientes del hospital fue también probado usando tiras de prueba de proteína de orina Petstix 8™ (Idexx Cat.# 98-06959-00).

De los 86 perros clínicamente normales, 68 (79%) tenía concentraciones de albúmina normalizadas <1.0 mg/dL, 16 (19%) tenían concentraciones de albúmina normalizadas >1.0 mg/dL y <30.0 mg/dL, y 2(2%) tenían concentraciones de albúmina normalizadas >30.0 mg/dL. De los 159 pacientes del hospital, 112 (70%) fueron tira de prueba de orina negativos y 51 de las 112 (46%) muestras de tira de prueba negativas tenían concentraciones de albúmina normalizadas >1.0 mg/dL. Por el contrario, 19 de 80 (24%) de las muestras con <1.0 mg/D1 de albúmina fueron positivos en la tira de prueba de orina (ver Tabla 6).

25 TABLA 6

| Concentraciones de albúmina de Orina normalizada (# de muestras) | Resultado de la Tira de Prueba de la Proteína de Orina (n=159) |             |          |            |
|--|--|-------------|----------|------------|
|  | Neg. (112)   | Rastro (20) | 1 + (15) | 2-4 + (12) |
| < 1.0 mg/dL (80)   | 61 (54%)   | 12 (60%)    | 5 (33%)  | 2 (17%)    |
| > 1.0 y < 30.0 mg/dL (58)  | 49 (44%)   | 6 (30%)     | 2 (13%)  | 1 (8%)     |
| > 30.0 mg/dL (21)  | 2 (2%)   | 2 (10%)     | 8 (53%)  | 9 (75%)    |

En las dos poblaciones examinadas, la prevalencia de microalbuminuria (>1.0 mg/dL y <30.0 mg/dL) que va de 19% a 36%. De estos resultados, aparece que la microalbuminuria es frecuente en un número significativo de perros. Además, el uso de las comercialmente disponibles tiras de prueba de la proteína de orina para la detección de rendimientos de albuminuria un número de considerable de resultados positivos falsos.

### 50 Ejemplo 8

#### *Purificación de suero de albúmina canina*

Este ejemplo describe un método para la producción de suero de albúmina canino. El suero canino fue ajustado a 50% (w/v) de sulfato de amonio, la solución sacudida durante 3 horas a 4°C, y el material insoluble precipitado por centrifugación a 10,000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante fue retirado y dializado en 25 mM Tris, Ph 8.0. El material soluble fue cargado sobre una pre-equilibrada, columna Hi-Trap Q-Sepharose (Farmacia, Peapack, NJ) y las proteínas eluidas usando un gradiente lineal de 0 a 1.0 M NaCl sobre 25 volúmenes de columna (CV). Las fracciones recogidas fueron analizadas por SDS-PAGE y fracciones que contienen albúmina canina fueron agrupados y almacenados hasta que sean necesarios. Usando este método, 414 mg de albúmina fue purificado de 20 de suero canino. La secuenciación de proteínas confirmó que la proteína purificada era albúmina canina.

### 60 Ejemplo 9

#### *Producción de anticuerpos de albúmina anti-canina*

Este ejemplo describe el método utilizado para producir anticuerpos monoclonales (Mabs) TNB1, TNB2, TNB3, TNB4, TNB5, TNB6 los cuales reconocen el suero de albúmina canino (CSA).

Ratones Balb/C fueron inmunizados por inyección subcutánea con Complete Freund's Adjuvant mezclado ya sea con 25 µg, 50 µg o 100 µg de suero de albúmina canina (disponible de Sigma, St. Louis, MO). Después de cuatro

## ES 2 356 382 T3

semanas, las muestras de sangre fueron obtenidas y las concentraciones del anticuerpo anti-CSA determinados por ELISA. Basados en este dato, los tres ratones inmunizados con 100  $\mu\text{g}$  de CSA se escogieron para un uso adicional en la producción de hibridomas. Dos de estos ratones se les dio inyecciones intravenosas (IV) conteniendo 100  $\mu\text{g}$  de CSA y el tercer ratón recibió 100  $\mu\text{g}$  por vía intraperitoneal. Tres días más tarde, los ratones fueron sacrificados, el bazo removido y vaciado de las células-T y las células del bazo fusionados con SP2/0 de células mieloma de ratón siguiendo protocolos estándares. Las colonias individuales del hibridoma fueron probados para la producción de MABs el cual reconoce CSA y colonias positivas se expandieron y la dilución clonada hasta que se establecieron líneas secretoras de MAB estables.

### 10 Ejemplo 10

#### *Producción de anticuerpos de albúmina anti-canino utilizando hibridación sustractiva*

15 Este ejemplo describe procedimientos que utilizan técnicas de hibridación sustractiva para producir anticuerpos monoclonales (Mabs) que reconocen el suero de albúmina canina (CSA).

Las líneas celulares anti- canina CSA fueron producidas utilizando el siguiente, método publicado de hibridación sustractiva. Los ratones Balb/C fueron inyectados vía intraperitoneal con 1.0 de Fracción V BSA (disponible de Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), seguido por inyecciones IP de ciclofosfamida (CY)(100 mg/kg) a 10 minutos, 24, y 48 horas de inyección post-BSA. Este tratamiento BSA/CY se repitió dos semanas después. Después de otras dos semanas, se le aplico al ratón una inyección subcutánea (SC) que contenía 100  $\mu\text{g}$  de CSA (producida tal como se describe en el Ejemplo 8) mezclada con Complete Freund's Adjuvant. Después de que habían pasado dos semanas adicionales, las muestras de sangre se obtuvieron y las concentraciones del anticuerpo suero contra CSA y BSA fueron determinados por ELISA. Una segunda inyección de CSA (100  $\mu\text{g}$ ) fue luego aplicada intraperitonealmente para incrementar las concentraciones de anticuerpos animales anti-CSA. Dos semanas más tarde, se aplico al ratón un inyección intravenosa (IV) de CSA (50  $\mu\text{g}$ ) y después de tres días, el ratón fue sacrificado, su splenocytes cultivado y fusionado con las células mieloma de ratón SP2/0 utilizando polietileno glicol (PEG) siguiendo procedimientos estándares. Colonias de hibridomas individuales fueron probados para la producción de MABs que reconocen CSA y colonias positivas se expandieron y la dilución clonada hasta que líneas de secreción MAB estables fueron establecidas. El procedimiento resulto en la producción de líneas de hibridoma H398 y H399.

En adición a las líneas celulares de hibridoma producidas por el procedimiento anterior, el siguiente procedimiento de hibridación sustractiva modificada se utilizo para producir líneas celulares de hibridoma anti-CSA adicionales. 30  $\mu\text{g}$  de CSA (producido como se describe en el Ejemplo 8) fueron inyectadas en la planta del pie de un ratón Balb/C. Tres meses después, se le aplico al ratón una inyección intraperitoneal (IP) que contiene 30  $\mu\text{g}$  de CSA. Cuatro meses después de la inyección IP, se le aplico al ratón una segunda inyección IP que contiene 1.0 mg de BSA, seguido por inyecciones IP de ciclofosfamida (CY)(100 mg/kg) a 10 minutos, 24, y 48 horas de inyección post-BSA. Después de dos semanas, este tratamiento BSA/CY se repitió y después de dos semanas más que habían transcurrido, se le aplico al ratón una inyección subcutánea (SC) de CSA (100  $\mu\text{g}$ ) mezclado con Complete Freund's Adjuvant. Después de otras dos semanas, las muestras de sangre fueron obtenidas y las concentraciones de suero del anticuerpo contra CSA y BSA fueron determinados por ELISA. Se le aplico al ratón una inyección intravenosa (IV) de CSA (50  $\mu\text{g}$ ) y tres días después, el ratón fue sacrificado, su splenocytes cultivados y fusionados con células mieloma de ratón SP2/0 utilizando polietileno glicol (PEG) siguiendo los procedimientos estándares. Colonias de hibridoma individuales fueron probados para la producción de MABs que reconocen CSA y colonias positivas fueron expandidas y la dilución clonada hasta que las líneas de secreción MAB estables fueron establecidas. Este protocolo resulto en la producción de líneas celulares de hibridoma H384, H385, H386, H387, H388, H389, H390, H391, H392, H393, H394, H395, H396, H400, H401 y H402.

### 50 Ejemplo 11

#### *Detección de suero albúmina canino por ELISA*

Este ejemplo describe el uso de un ELISA en fase sólida para probar la capacidad de los anticuerpos de suero albúmina anti-canino (CSA) para detectar CSA).

55 Los pocillos de una placa de microconcentración fueron cubiertos con CSA (50  $\mu\text{g}$ /pocillo) (producido como se describe en el Ejemplo 8) en un amortiguador carbonado (50 nM carbonato/bicarbonato, pH 9.6) y la placa almacenada durante la noche a 4°C. El siguiente día, el exceso de líquido fue removido, la placa se dejo a secar, y 150  $\mu\text{l}$  de amortiguador Bloqueante (0.1% de caseína en PBS conteniendo 0.05% Tween-20) fue añadido a cada pocillo. La placa fue incubada a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos, tras lo cual, el amortiguador Bloqueante fue removido y 60  $\mu\text{l}$  de hibridoma supernatante (ya sea indiluida o diluida en el amortiguador bloqueante) fueron añadidos a cada pocillo. Siguiendo a una hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos fueron lavados dos veces utilizando un amortiguador de lavado (PBS conteniendo 0.05% Tween-20), 50  $\mu\text{l}$  de HRP-conjugado, cabra, IgG anti-ratón y IgM (disponible de KPL Labs, Gaithersburg, MD) fueron añadidos a cada pocillo y la placa incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron dos veces con amortiguador de Lavado, y 50  $\mu\text{l}$  de Sistema de Sustrato TMB (disponible de KPL Labs) fueron añadidos a cada pocillo. La placa fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos después de cual, la reacción fue paralizada por la adición de 50  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico 2N a cada pocillo. La placa fue leída a 450 nM utilizando un lector de placa ELISA y los resultados se muestran abajo en la Tabla 7.

TABLA 7

| <b>Anticuerpo</b> | <b>Sin diluir</b> | <b>1:10</b> | <b>1:100</b> |
|-------------------|-------------------|-------------|--------------|
| TNB 1             | 1288              | 852         | 326          |
| TNB3              | 1242              | 1263        | 922          |
| TNB4              | 1449              | 1431        | 1546         |
| TNB5              | 1528              | 1585        | 1478         |
| TNB6              | 1782              | 1436        | 1103         |
| H386              | 1274              | 1273        | 1187         |
| H387              | 1394              | 1369        | 1326         |
| H388              | 1485              | 1529        | 1408         |
| H389              | 1685              | 1646        | 1265         |
| H390              | 1558              | 892         | 250          |
| H391              | 1490              | 1325        | 916          |
| H393              | 1744              | 1603        | 1640         |
| H394              | 435               | 955         | 577          |
| H395              | 1265              | 1049        | 1001         |
| H396              | 1564              | 1773        | 1390         |
| H397              | 49                | 59          | 48           |
| H398              | 1822              | 1641        | 1501         |
| H399              | 775               | 144         | 64           |
| H400              | 1572              | 1610        | 1239         |
| H401              | 1839              | 1683        | 1511         |
| H402              | 1799              | 1752        | 1447         |

## Ejemplo 12

35 *Detección de la albúmina de varias especies mediante ELISA*

Este ejemplo demuestra la capacidad de tres albuminas anti-canino monoclonales Abs para reconocer el suero de albúmina bovina (BSA), canino (CSA), equino (HSA) o humana (HuSA) mediante ELISA utilizando el protocolo esbozada en el Ejemplo 11 con la excepción de que los pocillos fueron cubiertos con diluciones seriales 3X (de 5  $\mu\text{g/ml}$  a 0.002/ml) de la albúmina indicada. En adición, 10  $\mu\text{g}$  del anticuerpo indicado fue utilizado en cada pocillo. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8

|  | <b>TNB3</b>          |            |            |             |
|--|----------------------|------------|------------|-------------|
|  | <b>Capa Proteica</b> |            |            |             |
| <b>Concentración de Albúmina (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | <b>BSA</b>           | <b>CSA</b> | <b>HSA</b> | <b>Husa</b> |
| 5  | .62                  | 3.53       | 1.67       | .12         |
| 1.667  | .52                  | 3.50       | 1.37       | .15         |
| .556   | .43                  | 3.51       | .87        | .17         |
| .185   | .57                  | 3.43       | .34        | .16         |
| .062   | .20                  | 3.14       | .19        | .15         |
| .021   | .17                  | 2.08       | .16        | .16         |
| .007   | .17                  | .35        | .13        | .13         |
| .002   | .11                  | .20        | .09        | .10         |
|  | <b>TNB6</b>          |            |            |             |
|  | <b>Capa Proteica</b> |            |            |             |
| <b>Concentración de Albúmina (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | <b>BSA</b>           | <b>CSA</b> | <b>HSA</b> | <b>HuSA</b> |
| 5  | .18                  | 3.68       | .90        | 1.69        |
| 1.667  | .42                  | 3.59       | .69        | .78         |

ES 2 356 382 T3

|    |  |            |            |            |             |
|----|--|------------|------------|------------|-------------|
|    | .556                                     | .30        | 3.59       | .52        | .47         |
|    | .185                                     | .24        | 3.43       | .32        | .23         |
| 5  | .062                                     | .22        | 3.17       | .26        | .26         |
|    | .021                                     | .21        | 2.36       | .22        | .22         |
|    | .007                                     | .20        | 1.18       | .21        | .22         |
|    | .002                                     | .22        | .55        | .21        | .23         |
| 10 | <b>H402</b>                              |            |            |            |             |
|    | <b>Capa Proteica</b>                     |            |            |            |             |
|    | <b>Concentración de albúmina (µg/ml)</b> | <b>BSA</b> | <b>CSA</b> | <b>HSA</b> | <b>HuSA</b> |
| 15 | 5  | .41        | 3.41       | .87        | .97         |
|    | 1.667                                    | .40        | 3.35       | .71        | .59         |
|    | .556                                     | .38        | 3.31       | .57        | .41         |
|    | .185                                     | .35        | 3.23       | .42        | .37         |
| 20 | .062                                     | .32        | 2.98       | .36        | .34         |
|    | .021                                     | .35        | 2.10       | .32        | .31         |
|    | .007                                     | .35        | 1.20       | .18        | .31         |
| 25 | .002                                     | .35        | .65        | .32        | .33         |

Esta data demuestra que los TNB3, TNB6 y H402 de mAb tienen una mayor afinidad para CSA si se compara con BSA, HSA o Husa.

Ejemplo 13

*Competición de ELISA utilizando la anti-albúmina H402, TNB3 y TNB6 de mAb*

Este ejemplo compara la capacidad de los anticuerpos monoclonales H402, TNB3 y TNB6 para disputarse la unión a la albúmina de suero canino (CSA). La competición entre los anticuerpos fue medido cubriendo una placa ELISA en su totalidad con CSA, añadiendo un anticuerpo primario etiquetado a todos los pocillos de la placa y luego midiendo la capacidad de varios anticuerpos sin etiquetar para competir con el anticuerpo primario para unirse a la CSA. (Todos los anticuerpos primarios fueron etiquetados utilizando biotina disponible de Pierce Chemical, Rockford, IL según las instrucciones de los fabricantes). De esta manera, cada placa fue utilizada para probar la capacidad de un anticuerpo primario simple para competir con dos mas anticuerpos anti-albúmina por la capacidad de unirse a CSA. En adición, el anticuerpo creció en contra del dominio extracelular de la afinidad humana elevada de IgE de la cadena alfa receptora (anti-FcεR1α) fue utilizada en cada como un control negativo. Los detalles del ensayo son como siguen:

Tres placas ELISA fueron cubiertas durante la noche a 4°C con CSA a 1µg/ml. El siguiente día, los pocillos fueron lavados utilizando amortiguador de Lavado (PBS + 0.05% Tween-20) y bloqueado con Solución Bloqueante (STABILCOAT®) IMMUNOASSAY STABILIZER; disponible de SurModics, Inc., Eden Prairie, Minnesota) según a las instrucciones del fabricante. Los pocillos fueron luego lavados utilizando amortiguador de Lavado, y 100 µl de un simple, etiquetado, anticuerpo primario, ya sea H402 a 20 ng/ml, TNB3 a 8 ng/ml o TNB6 a 12 ng/ml (las concentraciones se ajustaron utilizando amortiguador de Dilución (0.1% de caseína en PBS + 0.05% Tween-20)) fueron añadidos a todos los pocillos de una placa individual de modo que cada placa mantuvo un anticuerpo primario diferente. A una fila de pocillos en cada placa se agrego 100 µl de anticuerpo secundario sin etiquetar, ya sea H402, TNB3, TNB6 o anti-HuFCcR1 a 20 µg/ml. Diluciones seriales de dos tiempos fueron realizados, diluyendo cada anticuerpo secundario a través de la placa de modo que las concentraciones finales del anticuerpo secundario fueron de 10 µg/ml a 9 ng/ml. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente (RT) durante 2 horas, lavadas con amortiguador de Lavado y 100 µl peroxidasa de rábano picante conjugada estreptavidina (diluida 1:1000 en amortiguador de dilución) fueron añadidos. Seguido de una hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos fueron lavados con amortiguador de Lavado y 100 µl de solución de desarrollo (Sustrato TMB; disponible de KPL Labs, Gaithersburg, MD) fueron añadidos a cada pocillo. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, las placas fueron leídas a 450 nm utilizando un lector de placa ELISA. Los resultados de este ensayo se muestran debajo en la Tabla 9.

TABLA 9

| <b>H402 como Anticuerpo Primario</b>       |   |             |             |                     |
|--|---|-------------|-------------|---------------------|
|  | <b>Anticuerpo Competidor (secundario)</b> |             |             |                     |
| <b>Concentración de Anticuerpo (ng/ml)</b> | <b>H402</b>                               | <b>TNB3</b> | <b>TNB6</b> | <b>Anti-HuFCER1</b> |
| 10000                                      | .069                                      | 2.292       | .087        | 2.584               |
| 5000                                       | 0.164                                     | 2.328       | 0.195       | 2.576               |
| 2500                                       | 0.271                                     | 2.341       | 0.300       | 2.551               |
| 1250                                       | 0.517                                     | 2.275       | 0.559       | 2.569               |
| 625  | 1.212                                     | 2.255       | 1.093       | 2.592               |
| 312.5                                      | 2.104                                     | 2.262       | 1.683       | 2.540               |
| 156.25                                     | 2.548                                     | 2.293       | 2.239       | 2.557               |
| 78.125                                     | 2.670                                     | 2.381       | 2.402       | 2.512               |
| 39.06                                      | 2.752                                     | 2.461       | 2.514       | 2.518               |
| 19.53                                      | 2.765                                     | 2.427       | 2.655       | 2.660               |
| 9.77                                       | 2.798                                     | 2.657       | 2.611       | 2.639               |
| 0  | 2.710                                     | 2.641       | 2.577       | 2.642               |
| <b>TNB3 como Anticuerpo Primario</b>       |   |             |             |                     |
|  | <b>Anticuerpo Competidor (secundario)</b> |             |             |                     |
| <b>Concentración de Anticuerpo (ng/ml)</b> | <b>H402</b>                               | <b>TNB3</b> | <b>TNB6</b> | <b>Anti-HuFCER1</b> |
| 10000                                      | 2.295                                     | 0.090       | 2.290       | 2.479               |
| 5000                                       | 2.493                                     | 0.245       | 2.409       | 2.645               |
| 2500                                       | 2.445                                     | 0.395       | 2.247       | 2.508               |
| 1250                                       | 2.480                                     | 0.796       | 2.185       | 2.397               |
| 625  | 2.485                                     | 1.534       | 2.239       | 2.428               |
| 312.5                                      | 2.378                                     | 2.084       | 2.208       | 2.483               |
| 156.25                                     | 2.529                                     | 2.535       | 2.324       | 2.484               |
| 78.125                                     | 2.463                                     | 2.643       | 2.351       | 2.497               |
| 39.06                                      | 2.566                                     | 2.674       | 2.390       | 2.509               |
| 19.53                                      | 2.607                                     | 2.740       | 2.520       | 2.602               |
| 9.77                                       | 2.763                                     | 2.716       | 2.611       | 2.669               |
| 0  | 2.867                                     | 2.798       | 2.756       | 2.764               |
| <b>TNB6 como Anticuerpo Primario</b>       |   |             |             |                     |
|  | <b>Anticuerpo Competidor (secundario)</b> |             |             |                     |
| <b>Concentración de Anticuerpo (ng/ml)</b> | <b>H402</b>                               | <b>TNB3</b> | <b>TNB6</b> | <b>Anti-HuFCER1</b> |
| 10000                                      | 0.122                                     | 2.307       | 0.134       | 2.490               |
| 5000                                       | 0.303                                     | 2.410       | 0.310       | 2.604               |
| 2500                                       | 0.459                                     | 2.177       | 0.473       | 2.569               |
| 1250                                       | 0.769                                     | 2.276       | 0.733       | 2.550               |

ES 2 356 382 T3

|    |        |       |       |       |       |
|----|--------|-------|-------|-------|-------|
|    | 625    | 1.446 | 2.283 | 1.383 | 2.501 |
| 5  | 312.5  | 2.126 | 2.319 | 2.053 | 2.402 |
|    | 156.25 | 2.502 | 2.430 | 2.358 | 2.564 |
|    | 78.125 | 2.647 | 2.455 | 2.480 | 2.516 |
| 10 | 39.06  | 2.743 | 2.496 | 2.557 | 2.530 |
|    | 19.53  | 2.745 | 2.579 | 2.605 | 2.582 |
|    | 9.77   | 2.787 | 2.697 | 2.654 | 2.559 |
| 15 | 0      | 2.772 | 2.685 | 2.319 | 2.377 |

Los datos demuestran que los anticuerpos monoclonales H402 y TNB6 compiten para unir el suero de albúmina canina consistente con estos anticuerpos compartiendo la misma, o los cercanamente relacionados, epítopos. Los datos también demuestran la unión del suero de albúmina canino por TNB3 no es afectado por H402 o TNB6.

Ejemplo 14

*Unión de la albúmina canina y felina por H352, H398 y TNB3*

Este ejemplo compara la capacidad de tres anticuerpos anti-albúmina (H352, H398 & TNB3) para unir la albúmina canina (CSA) o felina (FSA).

El ensayo de unión fue realizado como sigue. Para habilitar la detección, peroxidasa de rábano picante (HRP) (Pierce Chemical, Rockford, IL) fue conjugado ya sea a CSA o FSA siguiendo el protocolo del fabricante. Los pocillos de una placa de microconcentración fueron cubiertos con un rango (de 10µg/ml a 9.77 ng/ml) de anticuerpo (ya sea H352, H398 o TNB3) en amortiguador de carbonato (50 mM carbonato/bicarbonato, pH 9.6) y las placas almacenadas durante la noche a 4°C. Al día siguiente, el exceso de líquido fue retirado y los pocillos se bloquearon utilizando solución de bloqueo (STABILCOAT® IMMUNOASSAY STABILIZER; disponible de SurModics, Inc., Eden Prairie, Minnesota) siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguido del retiro de la solución de bloqueo, los pocillos fueron lavados usando amortiguador de Lavado (PBS que contiene 0.05% Tween-20) y HRP-FSA (diluido 1:400 en amortiguador de carbonato) o HRP-CSA (diluido 1:800 en amortiguador de carbonato) fueron añadidos a los pocillos y la placa incubada a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos. La conjugada HRP-albúmina fue retirado, los pocillos lavados dos veces usando amortiguador de Lavado y 50 µl de sistema de sustrato TMB (disponible de KPL Labs, Gaithersburg, MD) fueron añadidos a cada pocillo. La placa fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos tras lo cual la reacción fue paralizada por la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 2N a cada pocillo. La placa fue leída a 450 nM usando un lector de placa ELISA. Los resultados se muestran abajo en la Tabla 10.

TABLA 10

| Concentración MAb (ng/ml) | mAb           |       |       |       |       |       |
|---------------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                           | H352          |       | H398  |       | TNB3  |       |
|                           | Capa Proteica |       |       |       |       |       |
|                           | FSA           | CSA   | FSA   | CSA   | FSA   | CSA   |
| 10000                     | 4.200         | 4.184 | 2.984 | 3.887 | 0.055 | 4.191 |
| 5000                      | 4.200         | 4.200 | 1.944 | 2.806 | 0.047 | 4.184 |
| 2500                      | 4.189         | 4.160 | 1.532 | 2.333 | 0.049 | 4.177 |
| 1250                      | 4.127         | 4.200 | 1.187 | 1.941 | 0.099 | 4.186 |
| 625                       | 2.740         | 4.084 | 0.493 | 0.769 | 0.043 | 4.178 |
| 312.5                     | 1.266         | 2.814 | 0.168 | 0.282 | 0.045 | 3.410 |
| 156.25                    | 0.713         | 1.598 | 0.095 | 0.135 | 0.043 | 2.400 |

ES 2 356 382 T3

|       |       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 78.13 | 0.324 | 0.859 | 0.078 | 0.090 | 0.042 | 1.109 |
| 39.06 | 0.178 | 0.413 | 0.053 | 0.063 | 0.043 | 0.543 |
| 19.53 | 0.107 | 0.236 | 0.047 | 0.055 | 0.049 | 0.309 |
| 9.77  | 0.077 | 0.132 | 0.050 | 0.051 | 0.059 | 0.191 |
| 0     | 0.044 | 0.048 | 0.048 | 0.061 | 0.049 | 0.048 |

Los datos del anticuerpo monoclonal H352 se une a FSA y CSA con afinidad más o menos igual. El anticuerpo monoclonal H398 también reconoce FSA y CSA aunque tiene mayor afinidad para CSA. Finalmente, los datos demuestran que el anticuerpo monoclonal TNB3 se une específicamente a CSA y no se une a FSA.

Ejemplo 15

Este ejemplo describe los niveles de albúmina presente en la nefropatía inducida *Dirofilaria immitis* canina. En este modelo, los animales están infectados con *D. immitis* lo cual resulta en daño renal debido al daño inducido del complejo anticuerpo antígeno de los glomérulos como se describe en Grauer, G.F., *et. al.*, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 39(4), 1988, p380-387. Se sabe en este modelo que el antígeno *D. immitis* aparece en la sangre aproximadamente siete meses después de la post infección. Para este ejemplo, los animales fueron infectados con *D. immitis* y las muestras de orina recogidas cada mes por cateterización. Debería notarse que en algunos casos, el proceso de cateterización puede resultar en niveles de albúmina elevados; como resultado, los animales fueron solo considerados positivos para la microalbuminuria cuando se les descubrió que eran microalbuminurico en dos muestras consecutivas. La cantidad de albúmina en cada muestra se determino utilizando un ensayo ELISA. Los resultados se muestran en la Tabla 11. Las cajas etiquetadas N/A indican en donde la muestra no estaba disponible.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 11

| Meses Post Infección | Identificador Animal |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |  |  |
|----------------------|----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|--|
|                      | HOP (A)              | IGH (A) | POR (A) | SSH (A) | XTJ (A) | YOH (A) | AXH (B) | CAH (B) | FVH (B) | GUH (B) | HOH (B) | VIP (B) |  |  |
|                      | 174.9                | 0.2     | 2.3     | 1.9     | 0.3     | 2.9     | 8.0     | 72.6    | 0.3     | 3.7     | 4.2     | 2.1     |  |  |
| 1                    | 2.1                  | 3.8     | 2.4     | 0.3     | N/A     | 8.7     | 4.0     | 4.0     |         | 3.7     | 0.2     | 0.4     |  |  |
| 2                    | 33.8                 | 2.0     | 9.5     | 2.4     | 29.9    | N/A     | 3.3     | 0.2     | 3.0     | 3.3     | 0.9     | 2.6     |  |  |
| 4                    | 1.3                  | 16.4    | 0.3     | 3.0     | 0.3     | 0.3     | 3.7     | 22.7    | 2.5     | 2.3     | 1.8     | 5.4     |  |  |
| 5                    | 2.2                  | 4.2     | N/A     | 2.0     | 18.1    | 4.2     | 3.4     | 3.0     | 0.3     | 1.9     | 0.2     | 4.1     |  |  |
| 6                    | 4.9                  | 9.9     | N/A     | 2.5     | N/A     | 0.3     | 0.2     | 2.6     | 2.7     | 1.5     | 0.4     | 0.4     |  |  |
| 7                    | 1.4                  | 48.1    | 0.3     | 0.3     | 20.7    | 45.6    | 3.9     | 0.3     | 1.9     | 20.7    | 3.3     | 8.1     |  |  |
| 8                    | 8.4                  | N/A     | 18.0    | N/A     | 60.6    | 16.2    | 3.1     | 4.8     | 6.5     | 2.8     | 8.5     | 15.4    |  |  |
| 9                    | 26.2                 | 2.9     | 4.4     | 0.4     | 46.8    | 16.1    | 6.0     | 0.3     | 24.6    | 3.6     | 0.3     | N/A     |  |  |
| 10                   | N/A                  | 11.0    | 3.4     | 10.8    | 26.2    | 15.7    | 13.1    | 21.3    | 54.0    | 60.3    | 0.2     | 46.0    |  |  |
| 11                   | 52.1                 | 125.7   | 43.5    | 36.9    | 180.6   | 67.8    | 3.9     | 27.3    | 11.5    | 6.5     | 59.5    | 73.6    |  |  |
| 12                   | 58.5                 | 16.2    | 22.2    | 52.9    | 51.3    | 54.9    | 6.8     | 76.2    | 23.4    | 5.9     | 97.4    | 167.2   |  |  |
| 13                   | 113.5                | 56.4    | 25.1    | 8.1     | 132.4   | 112.7   | 14.7    | 30.1    | 327.2   | 13.3    | 65.5    | 132.6   |  |  |
| 14                   | 134.3                | 60.2    | 132.1   | 16.8    | 123.0   | 82.9    | 66.6    | 65.8    | 500.0   | 5.0     | 285.7   | 69.06.1 |  |  |
| 15                   | 206.0                | 4.0     | 122.0   | 23.7    | 39.1    | 18.6    | 3.8     | 16.4    | 500.0   | 8.0     | 107.8   | 34.8    |  |  |
| 16                   | 37.3                 | 7.6     | 500.0   | 5.4     | 52.5    | 10.1    | 5.5     | 17.8    | 500.0   | 4.9     | 43.1    | N/A     |  |  |
| 17                   | N/A                  | 45.2    | N/A     | 8.6     | 181.6   | 89.1    | 30.9    | 19.8    | 500.0   | 16.4    | 53.0    | N/A     |  |  |
| 18                   | 18.8                 | 112.1   | 211.1   | 5.4     | 70.4    | 26.8    | 10.5    | 14.9    | N/A     | 5.4     | 21.3    | N/A     |  |  |
| 19                   | 16.7                 | 67.0    | 176.7   | 12.1    | 208.4   | N/A     | N/A     | 36.3    | N/A     | 4.9     | 57.1    | N/A     |  |  |
| 20                   | N/A                  | N/A     | N/A     | N/A     | 500.0   | N/A     | N/A     | N/A     | N/A     | 1.9     | N/A     | N/A     |  |  |
| 21                   | N/A                  | N/A     | N/A     | N/A     | N/A     | 37.9    | 9.2     | 41.7    | N/A     | 11.0    | 17.1    | N/A     |  |  |
| 22                   | 1.6                  | 4.7     | 75.8    | 9.1     | 500.0   | 27.2    | 22.2    | 500.0   | N/A     | 3.2     | 46.2    | N/A     |  |  |
| 23                   | 83.2                 | 37.6    | 30.3    | 17.5    | 500.0   | 60.3    | 54.3    | 500.0   | N/A     | 5.2     | 37.7    | N/A     |  |  |

## ES 2 356 382 T3

Los datos demuestran que la infección siguiente con *D. immitis*, hay un aumento progresivo en el nivel de albúmina en la orina. Adicionalmente, la mayoría de los animales se vuelven microalbuminuricos dentro de 1-2 meses siguiendo el tiempo de la aparición del antígeno *D. immitis* en la sangre. La microalbuminuria podría ser detectada en todos los animales hacia el final del estudio.

### Ejemplo 16

#### *Niveles de Albúmina en caninos que sufren de nefritis hereditaria*

Este ejemplo compara el nivel de microalbuminuria (MA) con un marcador comúnmente usado para la enfermedad renal, el porcentaje proteína urinaria/creatinina (UP/C), sobre tiempo en animales que sufren de nefritis hereditaria (HD). En este modelo, los animales llevan un defecto genético que resulta en el desarrollo rápido de la enfermedad renal durante el curso de la vida del animal como se describe en Lee, GE, American Journal of Veterinary Research, 1999: 60, p373-383. En este ejemplo, la orina fue recogida periódicamente de una colonia de perros normales y de una colonia de perros que sufren nefritis hereditaria. La cantidad de albúmina en cada muestra se determino utilizando un ensayo ELISA. En adición, la enfermedad renales considerada a estar presente cuando el porcentaje UP/C es mayor de 1.0. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 12.

TABLA 12

|                       |                   | <b>Identificación del Animal</b> |                   |                       |                   |                      |                   |                        |                   |                       |  |
|-----------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|------------------------|-------------------|-----------------------|--|
|                       |                   | <b>Fonzi (control)</b>           |                   | <b>Jack (control)</b> |                   | <b>Ned (control)</b> |                   | <b>Oscar (control)</b> |                   | <b>Pete (control)</b> |  |
| <b>Edad (semanas)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b>                | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b>     | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b>    | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b>      | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b>     |  |
| 8                     | 0.1               | 2                                | 1.6               | 0                     | 0.2               | 5                    | 0.6               | 2                      | 0.9               | 3                     |  |
| 11                    | 0.2               | 2                                | 0.7               | 5                     | 0.2               | 5                    | 0.2               | 8                      | 0.3               | 4                     |  |
| 13                    | 0.3               | 1                                | 0.3               | 0                     | 0.2               | 5                    | 0.9               | 3                      | 0.4               | 2                     |  |
| 15                    | 1.0               | 3                                | 0.6               | 6                     | 0.2               | 5                    | 0.3               | 4                      | 0.2               | 2                     |  |
| 17                    | 0.2               | 1                                | 0.2               | 3                     | 0.2               | 5                    | 0.1               | 3                      | 0.2               | 6                     |  |
| 19                    | 0.4               | 15                               | 0.5               | 4                     | 0.2               | 5                    |                   |                        | 0.1               | 3                     |  |
| 21                    | 0.1               | 4                                | 1.0               | 7                     | 0.2               | 5                    | 0.1               | 2                      | 0.1               | 1                     |  |
| 23                    | 0.3               | 0                                | 0.2               | 3                     | 0.2               | 5                    | 0.2               | 1                      | 0.1               | 1                     |  |
| 25                    | 0.6               | 1                                | 0.1               | 6                     | 0.2               | 5                    | 0.1               | 1                      | 0.1               | 20                    |  |
| 27                    | 0.1               | 1                                | 0.2               | 6                     | 0.2               | 5                    | 0.1               | 0                      | 0.1               | 6                     |  |
| 30                    | 0.1               | 2                                | 0.1               | 4                     | 0.2               | 5                    | 0.1               | 2                      | 0.0               | 1                     |  |
| 34                    | 0.2               | 220                              | 0.1               | 4                     | 0.2               | 5                    | 0.1               | 1                      | 0.1               | 2                     |  |
| 38                    | 0.1               | 1                                | 0.1               | 2                     | 0.2               | 5                    | 0.1               | 1                      | 0.1               | 4                     |  |
|                       |                   | <b>Ethan (HN)</b>                |                   | <b>Frasler (HN)</b>   |                   | <b>Greg (HN)</b>     |                   | <b>Ike (HN)</b>        |                   | <b>Lester (HN)</b>    |  |
| <b>Edad (semanas)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b>                | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b>     | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b>    | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b>      | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b>     |  |
| 8                     | 0.2               | 4                                | 0.1               | 6                     | 0.1               | 2                    | 1.0               | 6                      | 0.8               | 10                    |  |
| 11                    | 0.3               | 9                                | 0.2               | 4                     | 0.1               | 4                    | 0.2               | 10                     | 0.4               | 8                     |  |
| 13                    | 0.6               | 4                                | 0.2               | 1                     | 0.3               | 2                    | 0.2               | 1                      | 0.5               | 12                    |  |
| 15                    | 0.5               | 8                                | 0.3               | 12                    | 0.1               | 12                   | 0.7               | 7                      | 0.3               | 3                     |  |
| 17                    | 0.1               | 17                               | 0.6               | 358                   | 0.2               | 487                  | 1.0               | 557                    | 0.4               | 7                     |  |
| 19                    | 1.0               | 82                               | 2.3               | 314                   | 0.4               | 2                    | 4.4               | 918                    | 0.6               | 115                   |  |
| 21                    | 3.0               | 136                              | 1.1               | 30                    | 0.2               | 2                    | 6.6               | 1574                   | 1.0               | 561                   |  |
| 23                    | 6.2               | 4954                             | 5.1               | 2145                  | 0.3               | 71                   | 12.5              | 5560                   | 3.0               | 615                   |  |
| 25                    | 10.1              | 744                              | 9.0               | 3000                  | 1.6               | 603                  | 16.6              | 2920                   | 3.7               | 17                    |  |
| 27                    | 6.6               | 1179                             | 7.3               | 2020                  | 3.5               | 1499                 | 15.3              | 3904                   | 7.0               | 1477                  |  |
| 30                    | 15.7              | 2734                             | 12.3              | 2696                  | 5.7               | 1733                 | 16.5              | 2276                   | 9.3               | 1679                  |  |

ES 2 356 382 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

|                       |                   |                   |                   |                   |                      |                   |                   |                   |                   |                   |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 34                    | 11.6              | 1901              | 12.9              | 2                 | 8.2                  | 309               | 4.4               | 3608              | 8.7               | 1992              |
| 38                    | 6.4               | 3310              | 13.9              | 3597              | 8.8                  | 4845              | 8.5               | 4465              | 8.1               | 1919              |
|                       | <b>Nate (HN)</b>  |                   | <b>Newt (HN)</b>  |                   | <b>Quark (HN)</b>    |                   | <b>Quirt (HN)</b> |                   | <b>Eddie (HN)</b> |                   |
| <b>Edad (semanas)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b>    | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> |
| 8                     | 0.4               | 6                 | 0.2               | 5                 | 0.1                  | 2                 | 0.4               | 1                 | 1.6               | 16                |
| 11                    | 0.4               | 0                 | 0.4               | 0                 | 0.1                  | 3                 | 0.4               | 4                 | 0.2               | 10                |
| 13                    | 0.4               | 5                 | 0.2               | 4                 | 0.7                  | 11                | 0.2               | 3                 | 0.4               | 6                 |
| 15                    | 0.4               | 2                 | 0.1               | 19                | 0.3                  | 5                 | 0.1               | 1                 | 0.3               | 6                 |
| 17                    | 0.3               | 4                 | 1.1               | 116               | 0.4                  | 74                | 0.1               | 12                | 0.1               | 5                 |
| 19                    | 0.6               | 7                 | 1.5               | 265               | 0.6                  | 232               | 0.2               | 25                | 0.4               | 10                |
| 21                    | 0.2               | 52                | 2.4               | 1321              | 2.8                  | 620               | 0.6               | 267               | 1.2               | 1063              |
| 23                    | 2.1               | 340               | 8.7               | 2665              | 9.2                  | 1223              | 3.4               | 543               | 2.8               | 1307              |
| 25                    | 2.2               | 622               | 9.6               | 4711              | 8.8                  | 1938              | 4.6               | 1208              | 8.7               | 1947              |
| 27                    | 3.2               | 483               | 10.1              | 1309              | 7.8                  | 2007              | 9.1               | 3054              | 6.9               | 1052              |
| 30                    | 5.8               | 1529              | 9.0               | 2989              | 14.1                 | 3419              | 9.3               | 2747              | 13.9              | 3188              |
| 34                    | 7.3               | 1483              | 8.8               | 1806              | 13.1                 | 3055              | 9.9               | 6379              | 10.5              | 4927              |
| 38                    | 8.9               | 2955              | 8.1               | 6487              | 12.2                 | 3118              | 9.5               | 3044              | 12.7              | 6717              |
|                       | <b>Felix (HN)</b> |                   | <b>Fred (HN)</b>  |                   | <b>Gus (HN)</b>      |                   | <b>Neal (HN)</b>  |                   | <b>Norm (HN)</b>  |                   |
| <b>Edad (semanas)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b>    | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> |
| 8                     | 0.7               | 1                 | 0.3               | 3                 | 0.1                  | 5                 | 0.8               | 0                 | 0.3               | 1                 |
| 11                    | 0.1               | 8                 | 0.1               | 12                | 0.1                  | 4                 | 0.2               | 3                 | 0.1               | 1                 |
| 13                    | 0.1               | 1                 | 0.5               | 1                 | 0.1                  | 22                | 0.4               | 3                 | 0.1               | 0                 |
| 15                    | 0.3               | 5                 | 0.6               | 1                 | 0.2                  | 55                | 0.1               | 2                 | 0.5               | 1                 |
| 17                    | 0.8               | 122               | 0.5               | 6                 | 1.7                  | 24                | 0.4               | 2                 | 0.7               | 4                 |
| 19                    | 0.3               | 87                | 0.3               | 13                | 2.2                  | 77                | 0.6               | 428               | 0.5               | 7                 |
| 21                    | 0.8               | 903               | 0.8               | 9                 | 3.9                  | 16                | 0.6               | 210               | 1.3               | 354               |
| 23                    | 2.6               | 1679              | 0.6               | 81                | 9.3                  | 1565              | 6.6               | 1335              | 5.7               | 1535              |
| 25                    | 6.9               | 16170             | 1.9               | 152               | 6.4                  | 3950              | 8.4               | 4091              | 9.5               | 3290              |
| 27                    | 10.2              | 2452              | 3.5               | 11                | 5.2                  | 1263              | 10.1              | 1158              | 5.5               | 798               |
| 30                    | 12.0              | 2612              | 8.1               | 1887              | 8.3                  | 2648              | 9.2               | 2523              | 6.8               | 2796              |
| 34                    | 9.3               | 4146              | 7.1               | 3403              | 8.5                  | 4583              | 10.1              | 1767              | 11.5              | 2603              |
| 38                    | 10.4              | 6218              | 10.8              | 7141              | 7.9                  | 3759              | 10.4              | 2906              | 7.0               | 3403              |
|                       | <b>Paul (HN)</b>  |                   | <b>Quinn (HN)</b> |                   | <b> Scooter (HN)</b> |                   |                   |                   |                   |                   |
| <b>Edad (semanas)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b>    | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> | <b>Porc. UP/C</b> | <b>MA (µg/ml)</b> |
| 8                     | 0.6               |                   | 0.1               |                   | 1.4                  |                   |                   |                   |                   |                   |
| 11                    | 0.1               | 8                 | 0.1               | 1                 | 0.2                  | 3                 |                   |                   |                   |                   |
| 13                    | 0.4               | 1                 | 0.2               | 5                 | 0.3                  | 7                 |                   |                   |                   |                   |
| 15                    | 0.2               | 0                 | 0.2               | 1                 | 0.1                  | 21                |                   |                   |                   |                   |
| 17                    | 0.1               | 6                 | 0.1               | 3                 | 0.3                  | 66                |                   |                   |                   |                   |
| 19                    | 0.7               | 6                 | 0.6               | 5                 | 2.7                  | 323               |                   |                   |                   |                   |
| 21                    | 0.1               | 58                | 0.1               | 16                | 4.3                  | 20                |                   |                   |                   |                   |
| 23                    | 1.3               | 206               | 0.6               | 29                | 8.8                  | 2678              |                   |                   |                   |                   |
| 25                    | 2.0               | 598               | 1.5               | 224               | 11.3                 | 2957              |                   |                   |                   |                   |
| 27                    | 4.2               | 674               | 2.1               | 431               | 10.1                 | 3864              |                   |                   |                   |                   |
| 30                    | 4.0               | 2650              | 5.4               | 1468              | 11.2                 | 2118              |                   |                   |                   |                   |
| 34                    | 5.5               | 0                 | 10.0              | 1395              | 12.5                 | 5098              |                   |                   |                   |                   |
| 38                    | 6.4               | 4324              | 8.6               | 1624              | 8.4                  | 3238              |                   |                   |                   |                   |

## ES 2 356 382 T3

Los datos demuestran que hay un aumento progresivo en la microalbuminuria en animales que sufren de nefritis hereditaria. En adición, en prácticamente todos los animales, la microalbuminuria fue detectado anterior al porcentaje UP/C siendo superior a 1.0.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para identificar un animal que tiene enfermedad renal temprana o riesgo de desarrollar la enfermedad renal en fase final, dicho método comprendiendo la determinación de la cantidad de albúmina en una muestra de orina obtenida del animal, donde una cantidad de albúmina en un rango desde unos 10  $\mu\text{g/ml}$  a unos 300  $\mu\text{g/ml}$  en la muestra de orina, cuando el peso específica de la muestra es normalizado a 1.010  $\text{g/ml}$ , es indicativa de un animal que tiene la enfermedad renal temprana o esta en riesgo de enfermedad renal en su fase final, donde el animal es seleccionado del grupo que consiste de cánidos, félidos y équidos.

10 2. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad de albúmina en la muestra es determinada por:

- 15 a) poner en contacto la muestra de orina con un anticuerpo anti-albúmina para formar un complejo que comprende albúmina y el anticuerpo anti-albúmina;
- b) la detección de dicho complejo; y
- 20 c) la evaluación de la cantidad de albúmina presente en la muestra de orina de la cantidad de complejo de anticuerpo-albúmina detectado.

25 3. El método de la Reivindicación 1, donde la cantidad de albúmina en la muestra de orina es determinada utilizando un ensayo seleccionado del grupo que consiste en un inmunoensayo ligado a enzimas, un radioinmunoensayo, un inmunoensayo fluorescente, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de flujo lateral, un ensayo de tira reactiva, un ensayo de aglutinación, un ensayo basado en partículas, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo inmunodot, un ensayo inmunoblot, un ensayo de inmunodifusión, un ensayo de fosforescencia, un ensayo de flujo continuo, un ensayo de cromatografía, un ensayo basado en PAGE, un ensayo electrónico-sensorial, un ensayo de resonancia de plasmones de superficie y un ensayo de espectroscopia de correlación de fluorescencia.

30

35

40

45

50

55

60

65