



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 683**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**C12Q 1/00** (2006.01)  
**G01N 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06818453 .0**  
96 Fecha de presentación : **10.11.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1946103**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Método para determinar la actividad enzimática en una muestra histopatológica.**

30 Prioridad: **10.11.2005 EP 05447252**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.04.2011**

73 Titular/es: **PamGene B.V.**  
**Nieuwstraat 30**  
**5211 'S Hertogenbosch, NL**

72 Inventor/es: **Boender, Pieter Jacob Boender**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 357 683 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

**Campo de la Invención**

5 **[0001]** La presente invención se refiere al ensayo de la actividad enzimática en una muestra biológica. En particular, la presente invención se refiere al ensayo de la actividad enzimática en lisados celulares obtenidos de muestras biológicas fijadas.

**Antecedentes**

10 **[0002]** Se están analizando muestras biológicas de diversas formas con diversos fines. La histología es un componente clave del diagnóstico de enfermedades humanas y animales. Típicamente, las muestras biológicas se fijan, se embeben, se seccionan y se tiñen con el fin de un examen histológico, citológico, hematológico o microbiológico. Es evidente que el objetivo de un fijador es la detención de la autólisis y de la descomposición bacteriana, la estabilización de los constituyentes celulares y tisulares, y la conservación de proteínas y sustancias tisulares. Están disponibles una gran diversidad de fijadores. Los fijadores universales empleados más ampliamente son aldehídos tales como formaldehído y glutaraldehído. Por ejemplo, el formaldehído, como formaldehído tamponado al 4% o formalina tamponada al 10%, se usa principalmente para secciones embebidas en parafina rutinarias. Los aldehídos forman entrecruzamientos entre proteínas, siendo la reacción principalmente con el aminoácido básico lisina, y también pueden estar implicados otros grupos tales como imino, amido, peptídicos, guanidilo, hidroxilo, carboxilo, SH y anillos aromáticos. Las proteínas solubles se fijan a proteínas estructurales y se vuelven insolubles.

20 **[0003]** Los fijadores alternativos incluyen agentes oxidantes tales como iones metálicos y complejos tales como tetróxido de osmio y ácido crómico; y agentes desnaturalizantes de proteínas tales como ácido acético, alcohol metílico (metanol) y alcohol etílico (etanol).

25 **[0004]** Típicamente, el uso de fijadores (químicos) como se ha descrito anteriormente puede posponerse hasta que sea necesario por archivado de las muestras biológicas después de embeberlas en una matriz de embebimiento tal como, por ejemplo, moldes de embebimiento de plástico. El examen de la anatomía microscópica proporciona nuevas percepciones importantes de los mecanismos patológicos, aunque la fijación de una muestra biológica es incompatible con el análisis bioquímico de la función de proteínas o de la actividad enzimática en esa muestra debido a que la fijación, por su propia naturaleza, destruye las células y congela los procesos celulares dinámicos, y la presencia de pequeñas moléculas difundibles y la actividad enzimática se pierden durante la fijación química.

30 **[0005]** Sin embargo, un estudio adicional de la función de proteínas y el análisis de las reacciones enzimáticas en una muestra biológica que se selecciona por examen histológico reforzaría el valor de la investigación clínica y del diagnóstico *in vitro*.

35 **[0006]** La transducción de señales es una de las áreas más importantes de investigación en la investigación biológica e implica muchos tipos de interacciones. Uno de los mecanismos principales empleado frecuentemente por las células para regular su actividad y, en particular, para regular los procesos de transducción de señales, implica cambios en la fosforilación de proteínas. Se cree que tantas como 1000 proteínas quinasas y 500 proteínas fosfatasa en el genoma humano están implicadas en los procesos de fosforilación. Las dianas de fosforilación incluyen un gran grupo de moléculas de señalización, incluyendo enzimas.

40 **[0007]** La actividad de moléculas biológicamente activas, tales como enzimas, también está regulada con frecuencia por interacciones directas con otras moléculas o moléculas reguladoras. La regulación de enzimas controla su actividad proporcionando un intervalo completo de control, de muy fino a aproximado. Se usan muchos mecanismos para regular, por ejemplo, inhibir enzimas en sistemas vivos.

45 **[0008]** En general, a pesar de los muchos progresos, el sistema complejo en el que sustratos particulares se someten a la acción o acciones de enzimas específicas requiere todavía muchos exámenes moleculares para caracterizar propiedades todavía desconocidas de enzimas que dirigen rutas de señalización que, a su vez, controlan el crecimiento celular, la progresión de enfermedades y la diferenciación celular.

50 **[0009]** La presente invención proporciona el ensayo de la actividad de características subcelulares, en particular enzimas, con respecto al diagnóstico histológico de una muestra biológica, llenando el vacío entre los datos de ensayo tradicionales y de la biología molecular.

**[0010]** La presente invención tiene como objetivo proporcionar métodos para ensayar la actividad enzimática de muestras biológicas examinadas por histología.

55 **[0011]** La presente invención tiene como objetivo correlacionar la histología y la actividad enzimática de

una muestra biológica.

**[0012]** En particular, la presente invención tiene como objetivo proporcionar datos de la actividad enzimática para una muestra biológica seleccionada por su patrón histoquímico o inmunohistoquímico.

5 **[0013]** La presente invención tiene como objetivo proporcionar métodos para explorar la actividad enzimática en una plataforma múltiple.

**[0014]** La presente invención tiene como objetivo proporcionar ensayos enzimáticos que puedan automatizarse, en particular en la industria farmacéutica, ya que las moléculas biológicamente activas tales como enzimas desempeñan con frecuencia papeles clave importantes en el descubrimiento de fármacos.

10 **[0015]** La presente invención tiene como objetivo proporcionar métodos para la diferenciación de muestras clínicas basándose en la actividad enzimática en la investigación clínica y el diagnóstico *in vitro*.

#### Descripción Resumida de la Invención

15 **[0016]** La presente invención proporciona un nuevo método para la medición de la generación de perfiles y huellas de la actividad quinasa en lisados de muestras preparadas conjuntamente y examinadas histológicamente. En particular, la presente invención proporciona un método para correlacionar la histología y la actividad enzimática de una muestra biológica, comprendiendo el método las etapas de:

(i) proporcionar una muestra biológica crioconservada, en la que dicha muestra comprende una serie de secciones cortadas consecutivamente;

(ii) obtener datos histológicos de un subconjunto de secciones de dicha serie secciones;

20 (iii) lisar un segundo subconjunto de secciones de dicha serie de secciones para obtener un lisado en el que se conserven actividades enzimáticas específicas;

(iv) ensayar el lisado de la etapa (iii) para determinar su actividad quinasa con uno o más sustratos enzimáticos que comprenden secuencias de aminoácidos inmovilizadas en una micromatriz; y

(v) correlacionar la histología y la actividad quinasa de la muestra biológica.

25 **[0017]** Los métodos de acuerdo con la presente invención contribuyen al descubrimiento de rutas relacionadas con enfermedad a nivel de la señalización celular. Los presentes métodos son valiosos para el descubrimiento y validación de nuevas dianas. Una diana es una molécula o estructura molecular cuya actividad, cuando se ve influenciada por cualquier medio, tendrá efectos deseables sobre las células que contienen esta molécula. Un diana es una proteína o una enzima que puede usarse (como diana) por la industria farmacéutica para desarrollar nuevos fármacos. Al mismo tiempo, este tipo de huella de la actividad enzimática puede usarse como herramienta para encontrar conjuntos de biomarcadores de toxicidad y eficacia predictivos que puedan usarse como ayuda en ensayos clínicos en el campo de la oncología. La expresión "eficacia predictiva" se refiere a la medición de un efecto por, por ejemplo, un fármaco en una diana. La expresión "conjunto de biomarcadores de toxicidad" se refiere a la medición de efectos secundarios de un fármaco sobre una no diana. Por lo tanto, los datos de histopatología y biología molecular pueden mostrar efectos indirectos de un tratamiento farmacológico. Los efectos de fármacos sobre otras partes de una célula que no sean la diana conducen con frecuencia a efectos secundarios no deseados. Los métodos de la presente invención permiten la predicción de estos denominados efectos fuera de diana de modo que puedan prevenirse los efectos secundarios.

#### 40 Descripción Detallada de la Invención

**[0018]** Antes de describir el presente método y dispositivos usados en la invención, debe entenderse que esta invención no se limita a métodos, componentes o dispositivos descritos particulares, ya que tales métodos, componentes y dispositivos pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria no pretende ser limitante, puesto que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

45 **[0019]** A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria puede usarse en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación los métodos y materiales preferidos.

50 **[0020]** En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "un/a" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto imponga claramente otra cosa.

- [0021] La presente invención llena el vacío entre la tinción histoquímica tradicional y el análisis microscópico y la recopilación de datos de ensayo de biología molecular, proporcionando métodos como se describen en la presente memoria para ensayar la actividad de características subcelulares, en particular enzimas, respecto al diagnóstico histológico en una muestra biológica.
- 5 [0022] Por “enzimas” los inventores hacen referencia a proteínas que son capaces de modificar otras proteínas. Una proteína modificada —denominada “sustrato”— podría ser otra enzima o cualquier otra proteína que participe en la misma ruta de transducción de señales. Además, los ácidos nucleicos, azúcares, etc. pueden modificarse por enzimas.
- 10 [0023] Los fijadores usados más ampliamente se refieren a agentes para la unión de proteína-proteína tales como formaldehído y glutaraldehído. Los fijadores alternativos incluyen alcohol metílico y etílico, que también alteran la estructura de las proteínas, principalmente debido a la alteración de los enlaces hidrófobos que contribuyen al mantenimiento de la estructura terciaria.
- 15 [0024] Al contrario que la interferencia irreversible conocida de los fijadores (químicos) en el mantenimiento de una estructura proteica apropiada, los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que un lisado obtenido a partir de una muestra fijada, en particular una no embebida en formalina o, más particularmente, una sección o muestra biológica crioconservada, permitía todavía la medición de la actividad enzimática en el lisado por control de su reacción con un sustrato apropiado, mientras que las características biológicas podían definirse por procedimientos histológicos o inmunohistoquímicos convencionales.
- 20 [0025] Dentro la presente memoria descriptiva, el término “crioconservación” se refiere al tratamiento de una muestra biológica con un crioprotector, seguido de enfriamiento a una baja temperatura por debajo de cero de (típicamente)  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$  (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). Los términos “crioprotector” y “solución de vitrificación” se usan indistintamente por toda la presente memoria descriptiva y se refieren a una solución suficientemente no tóxica y suficientemente estable para permitir
- 25 que se mantenga la viabilidad de una muestra y se evite la formación de hielo.
- [0026] Por consiguiente, dentro de una realización de la presente invención se proporciona un método como se describe en la presente memoria, en el que la muestra biológica para la que puede buscarse una correlación entre los datos histológicos y la actividad enzimática dentro de los compartimentos celulares correspondientes se trata con una solución de vitrificación o crioprotector adecuado antes de la crioconservación. Típicamente, la solución de vitrificación evita los daños celulares. Y así, las reacciones bioquímicas que de otro modo conducirían a la muerte celular se interrumpen eficazmente. La solución de vitrificación permite la conversión del material en un sólido amorfo tipo vidrio que carece de cualquier estructura cristalina. Al mismo tiempo, la mayoría de las soluciones de vitrificación conocidas en la técnica también desnaturalizan las proteínas de la muestra, impidiendo de este modo un análisis enzimático
- 30 posterior. Los presentes inventores han observado ahora que una crioconservación particular permitiría todavía el análisis enzimático de una muestra biológica previamente fijada.
- [0027] Dentro de una realización de la presente invención, se proporciona un método como se describe en la presente memoria, en el que se usa un fijador químico distinto de formalina, en particular un fijador basado en etanol.
- 35 [0028] Como alternativa, son soluciones de vitrificación o crioprotectores adecuados particulares para su uso en la presente invención, por ejemplo, OCT (Baxter M7148-4), M1 (Lipsahw) o Tissue-Tek<sup>®</sup> OTC (Sakura Finetechnical Co).
- [0029] Más en particular, dentro de otra realización de la presente invención se proporciona un método como se describe en la presente memoria en el que dicho crioprotector es Tissue-Tek<sup>®</sup> OTC (medio de
- 40 Temperatura de Corte Óptima, Sakura Finetechnical Co).
- [0030] Las muestras biológicas fijadas están rutinariamente embebidas en un material sólido que servirá de soporte a su corte en secciones muy finas. Para embeber una muestra de tejido, el agua del tejido se sustituye primero por disolventes, tales como alcohol y xileno, y después con un líquido tal como cera fundida (parafina) o solución epoxi, que puede solidificarse posteriormente por enfriamiento y
- 45 polimerización.
- [0031] Dentro de la presente invención, el crioprotector puede servir además como medio de embebimiento. Por lo tanto, una vez que se embebe la muestra biológica por tratamiento con el crioprotector, puede congelarse y almacenarse hasta que sea necesario. A partir de este material crioconservado, pueden prepararse después cortes muy finos usando una herramienta de corte tal como un microtomo o, como alternativa, un criotomo que puede ser tan simple como una hoja de bisturí o puede
- 50 ser una máquina compleja. Las secciones para microscopía óptica de rutina tienen un espesor típicamente de 5-10  $\mu\text{m}$ . Excepcionalmente, las secciones finas pueden tener un espesor de menos de 2

µm. Para microscopía electrónica, las secciones tienen típicamente un espesor de 50-100 nanómetros. Las secciones cortadas consecutivamente pueden someterse a procedimientos histológicos convencionales, que representan la muestra biológica fijada y embebida, o pueden someterse al ensayo enzimático. Dentro de la presente invención, a partir de un primer subconjunto de secciones, se obtienen datos histológicos y, a partir de un segundo subconjunto de secciones, se obtiene un lisado en el que pueden conservarse y detectarse actividades enzimáticas específicas.

5

**[0032]** Dentro de los métodos de la presente invención, un subconjunto de la serie de secciones que componen la muestra biológica original se examina por visualización con ayuda de tinción. La mayoría de las células son esencialmente transparentes con escaso o ningún pigmento intrínseco. Se usan tinciones para conferir contraste, para hacer que los componentes tisulares sean visiblemente manifiestos. La elección de una tinción particular se basará habitualmente en la aplicación de moléculas particulares que pueden teñirse selectivamente usando marcadores radiactivos, reacciones enzimáticas o una unión a antígeno específica.

10

**[0033]** Los procedimientos de fijación, embebimiento, corte y tinción de muestras biológicas son de acuerdo con las instrucciones del fabricante y/o son conocidos para el experto en la materia.

15

**[0034]** Dentro de una realización de la presente invención, se proporciona un método como se describe en la presente memoria, en el que la muestra biológica está embebida en parafina.

**[0035]** La obtención de datos histológicos puede ser de acuerdo con los métodos que se conocen en la técnica, incluyendo inmunohistoquímica o hibridación *in situ* (ISH) convencional.

20

#### Lisis de material biológico embebido y conservación de actividades enzimáticas seleccionadas

**[0036]** Dentro de la presente invención, el material biológico crioconservado seccionado se examina usando herramientas histológicas o se lisa para tener un lisado celular para un análisis enzimático posterior.

25

**[0037]** En la investigación biológica, se usan detergentes para lisar las células y liberar las proteínas solubles. Generalmente, concentraciones moderadas de detergente suaves (es decir, no iónicos) comprometen la integridad de las membranas celulares, facilitando de este modo la lisis de las células y la extracción de proteínas solubles, con frecuencia en su forma nativa.

30

**[0038]** Los detergentes pueden ser desnaturizantes o no desnaturizantes con respecto a la estructura de las proteínas. Los detergentes desnaturizantes pueden ser aniónicos, tales como dodecil sulfato sódico (SDS) o catiónicos tales como bromuro de etil trimetil amonio. Estos detergentes rompen totalmente las membranas y desnaturizan las proteínas rompiendo las interacciones proteína-proteína. Los detergentes no desnaturizantes pueden dividirse en detergentes no iónicos tales como Triton® X-100, sales biliares tales como colato y detergentes zwitteriónicos tales como CHAPS.

35

**[0039]** Se conocen bien en la técnica condiciones para la lisis de materiales biológicos o células.

**[0040]** Dentro de la presente invención, el material biológico seccionado se lisa en condiciones no desnaturizantes usando, por ejemplo, medio de lisis basado en Triton X-100 convencional.

40

**[0041]** La composición de los medios de lisis respecto a la actividad enzimática de interés a controlar comprende agentes que conserven selectivamente actividades enzimáticas específicas suprimiendo o eliminando al mismo tiempo otras actividades enzimáticas que no sean de interés. Por ejemplo, la actividad quinasa enzimática puede medirse si el tampón de lisis contiene inhibidores específicos de fosfatasa, tal como una mezcla que contiene Triton X-100 y pirofosfato sódico, fluoruro sódico y ortovanadato sódico.

#### Muestra

45

**[0042]** La presente invención se refiere a muestras biológicas que comprenden enzimas como moléculas de analitos biológicamente activos, que permiten el descubrimiento de actividades para las que el arsenal de enzimas conocido actualmente no fue seleccionado evolutivamente.

50

**[0043]** La expresión "muestra biológica" como se usa en la presente memoria, se refiere a una muestra obtenida de un organismo tal como un ser humano, planta, bacteria, hongo, etc., o de componentes (por ejemplo, células) de dicho organismo. La muestra puede ser de cualquier tejido o fluido biológico. Frecuentemente, una muestra será una "muestra clínica", que es una muestra obtenida de un paciente. Dichas muestras incluyen, pero sin limitación, esputo, líquido cefalorraquídeo, sangre, fracciones sanguíneas tales como suero incluyendo suero total (por ejemplo, SFC) y plasma, células sanguíneas (por

ejemplo, glóbulos blancos), muestras de tejido o biopsia con aguja fina, orina, líquido peritoneal y líquido pleural, o células de los mismos.

5 **[0044]** Particularmente, la presente invención se refiere al análisis de la actividad quinasa en una muestra criopreservada. Las quinasas que pueden analizarse incluyen, pero sin limitación, quinasas tales como quinasa de calcio/calmodulina, quinasas dependientes de ciclina, quinasas de señalización de lípidos, quinasas activadas por mitógeno, PDK1-PKB/Akt, PKA, PKC, PKG, proteínas tirosina quinasas no receptoras, proteínas tirosina quinasas receptoras, serina/treonina quinasas.

**[0045]** Los métodos de acuerdo con la presente invención se refieren igualmente a quinasas sin una función biológicamente activa conocida.

## 10 Sustratos

15 **[0046]** Pueden usarse una amplia diversidad de moléculas diferentes como sustratos dentro de la presente invención. El término "sustrato" dentro de la presente memoria descriptiva se refiere a un sustrato enzimático que es una sustancia sobre la que actúa una enzima en una reacción bioquímica. Los presentes métodos contemplan, como sustratos adecuados, secuencias de aminoácidos, incluyendo péptidos, proteínas, enzimas, sustratos enzimáticos, receptores de hormonas, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpo, haptenos y aptámeros; secuencias de ácido incluyendo oligonucleótidos; y oligosacáridos. Los métodos de acuerdo con la presente invención se ejemplifican particularmente en la presente memoria en los términos de proteínas como sustratos.

20 **[0047]** Por consiguiente, en una realización de la presente invención, se proporcionan métodos en los que dicho sustrato se selecciona del grupo que comprende secuencias de aminoácidos incluyendo péptidos, proteínas, enzimas, receptores de hormonas, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo y haptenos.

25 **[0048]** Pueden seleccionarse sustratos igualmente útiles del grupo que comprende agonistas y antagonistas; toxinas y venenos; epítomos virales; hormonas (por ejemplo, esteroides, etc.) y receptores de hormonas; fármacos; lectinas; azúcares; proteínas de unión a carbohidratos y otros agentes de interacción.

### Soporte sólido poroso

30 **[0049]** Los sustratos enzimáticos útiles dentro de la presente invención pueden inmovilizarse en un soporte sólido. Se han descrito en la técnica varios materiales adecuados para su uso como soporte en la presente invención. Los materiales particularmente adecuados para su uso como soporte en la presente invención incluyen cualquier tipo de soporte sólido en la técnica. Más materiales particularmente adecuados para su uso como soporte en la presente invención incluyen cualquier tipo de soporte sólido poroso conocido en la técnica. La expresión "soporte poroso", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un soporte que posee o está lleno de poros, en el que el término "poro" se refiere a una abertura diminuta o microcanal por el que puede absorberse o a través del cual puede pasar materia. Particularmente, cuando los poros permiten el paso de materia a través de los mismos, el soporte es probablemente permeable.

40 **[0050]** Son soportes porosos útiles particulares que se emplean en los métodos descritos en la presente memoria descriptiva soportes porosos tridimensionales, que permiten el movimiento presurizado de líquido, por ejemplo, la solución de muestra, a través de su estructura. Como tales, los soportes porosos útiles particulares que se emplean en los presentes métodos poseen una naturaleza permeable o de flujo continuo.

45 **[0051]** Por consiguiente, en una realización de la presente invención se proporcionan métodos en los que dicho soporte sólido es un soporte sólido de flujo continuo tridimensional, que comprende canales que lo atraviesan.

50 **[0052]** Un soporte sólido poroso adecuado para su uso dentro de la presente invención puede estar fabricado de, por ejemplo, un metal, un óxido cerámico de metal o un polímero orgánico. En vista de la resistencia y rigidez, puede usarse un metal o un óxido cerámico de metal. Por encima de todo, en vista de la resistencia térmica y de la resistencia a productos químicos, puede usarse un óxido de metal. Además, los óxidos de metal proporcionan un soporte que tiene tanto una alta densidad de canales como una alta porosidad, permitiendo una alta densidad de matrices que comprenden diferentes primeras sustancias de unión por unidad de superficie para la aplicación de muestra. Además, los óxidos de metal son altamente transparentes a la luz visible. Los óxidos de metal son relativamente baratos ya que no requieren el uso de ninguna tecnología de microfabricación típica y que ofrecen un control mejorado sobre la distribución de líquido sobre la superficie del soporte, tal como una membrana de óxido de metal fabricada electroquímicamente. Pueden fabricarse membranas de óxido de metal que tienen canales

orientados que las atraviesan mediante ataque electroquímico de una lámina de metal.

**[0053]** Por consiguiente, en una realización de la presente invención se proporcionan métodos en los que dicho soporte sólido es un soporte de óxido de metal.

5 **[0054]** Los soportes o membranas de óxido de metal, como se emplean en los métodos de la presente invención, pueden ser películas de óxido anódico. Como se conoce bien en la técnica, el metal de aluminio puede anodizarse en un electrolito para producir una película de óxido anódico. El procedimiento de anodización da como resultado un sistema de grandes poros que se extienden desde una cara y se interconectan con un sistema de poros más pequeños que se extienden desde la otra cara. El tamaño de poro se determina por los diámetros mínimos de los poros más pequeños, mientras que los caudales se determinan en gran medida por la longitud de los poros más pequeños, que pueden ser muy cortos. Por consiguiente, dichas membranas pueden tener canales orientados que las atraviesan parcialmente ramificados, con un diámetro bien controlado y propiedades superficiales químicas útiles. El espesor útil de los soportes o membranas de óxido de metal, como se emplean en los métodos y aparatos de la presente invención, puede variar por ejemplo de 50  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$  (incluyendo espesores de 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 y 140  $\mu\text{m}$ ). Un ejemplo adecuado particular de espesor de soporte es de 60  $\mu\text{m}$ .

**[0055]** Un diámetro de poro de soporte adecuado varía de 150 a 250 nm, incluyendo 160, 170, 180, 190, 200, 210, 230 y 240 nm. Un ejemplo adecuado particular de diámetro de poro es de 200 nm. Estas dimensiones no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

20 **[0056]** Por consiguiente, en una realización adicional de la presente invención se proporcionan métodos en los que dicho soporte de óxido de metal es un soporte de óxido de aluminio.

**[0057]** Ventajosamente, las membranas de óxido de metal como se describen en la presente memoria son transparentes, especialmente si están húmedas, lo que permite ensayos usando diversas técnicas ópticas. El documento WO 99/02266 que describe el soporte o membrana porosa Anopore™ es ejemplar a este respecto.

25 **[0058]** Además, puede aplicarse una presión positiva o negativa a las matrices para bombear, por ejemplo, una solución de muestra dinámicamente hacia arriba y hacia abajo a través de los poros del soporte. Dicho bombeo dinámico permite la retirada inmediata y la capacidad de realizar una detección a tiempo real de los productos generados a partir de una reacción que tiene lugar dentro de los poros del soporte por unión rápida de dichos productos generados a las paredes de los poros del soporte.

30 **[0059]** Por consiguiente, en una realización de la presente invención se proporcionan métodos en los que dicho ensayo del lisado para una reacción enzimática con uno o más sustratos es por incubación dinámica.

35 **[0060]** El bombeo de la solución de lisado dinámicamente hacia arriba y hacia abajo a través de los poros del soporte puede aumentar la difusión de la enzima a moléculas de sustrato, puede aumentar la velocidad de acumulación de enzima unida específicamente a un compañero de unión de sustrato y, por consiguiente, puede dar como resultado una oportunidad aumentada para que enzimas de alta afinidad poco frecuentes se unan a un sustrato. Además, las enzimas unidas pueden sustituirse mediante enzimas de mayor afinidad durante un periodo de exposición al sustrato prolongado, permitiendo de este modo la selección de aquellas enzimas con la mayor afinidad por un sustrato dado.

40 **[0061]** En una realización adicional, se proporcionan métodos en los que dicha incubación dinámica comprende someter dicho soporte poroso a al menos un ciclo de flujo del lisado hacia delante y hacia atrás a través de dichos canales que lo atraviesan. Dicho flujo hacia delante y hacia atrás se establece por aplicación de una presión positiva y negativa alterna sobre el lisado respecto a la presión ambiental circundante, que forzará al lisado a fluir en una dirección hacia arriba y hacia abajo a través del soporte poroso. Como tal, una presión positiva dentro del contexto de la presente invención se refiere a una presión por encima de la presión atmosférica. Una presión negativa dentro del contexto de la presente invención se refiere al vacío o a una presión por debajo de la presión atmosférica.

45 **[0062]** La duración de un ciclo de flujo de muestra hacia delante y hacia atrás a través del sustrato poroso puede comprender entre 10 min y 1 s. Habitualmente, la duración de un ciclo comprende entre 5 min y 10 s. Más habitualmente, la duración de un ciclo comprende entre 2 min y 30 s. Un ejemplo adecuado particular de duración de un solo ciclo de flujo hacia delante y hacia atrás es de 60 s.

**[0063]** Un caudal óptimo es tal que el tiempo de permanencia de las moléculas de muestra cerca de las moléculas inmovilizadas es suficiente para generar acontecimientos de interacción de cantidades medibles en el menor tiempo posible.

55 **[0064]** Los métodos de acuerdo con la presente invención hacen uso de una plataforma múltiple tridimensional con poros interconectados que permite una cinética a tiempo real. Esta tecnología puede

5 aumentarse a escala y permite el análisis en paralelo de muchas cientos de muestras en muchos cientos de sustratos diferentes. Los métodos de acuerdo con la presente invención permiten el control continuo, así como discontinuo, de las interacciones entre enzima y sustrato. Por consiguiente, los métodos de acuerdo con la presente invención permiten la determinación de una interacción de enzima-sustrato a tiempo real.

**[0065]** Dentro de la presente invención, los sustratos pueden unirse o adherirse a la superficie de un soporte sólido poroso, incluyendo la unión o adherencia a la superficie interna de dicho soporte.

10 **[0066]** Los sustratos pueden inmovilizarse covalentemente (por ejemplo, utilizando grupos tiol reactivos individuales de restos de cisteína) o no covalentemente pero específicamente (por ejemplo, mediante anticuerpos inmovilizados, el sistema de biotina/estreptavidina y similares), por cualquier método conocido en la técnica. Los ejemplos adicionales de los diversos métodos que están disponibles para unir moléculas diana a soportes porosos incluyen, pero sin limitación, biotina-ligando formando no covalentemente un complejo con estreptavidina, S-H-ligando unido covalentemente mediante un reactivo alquilante, tal como una yodoacetamida o maleimida, amina-ligando unido covalentemente mediante un grupo carboxilato activado (por ejemplo, acoplado a EDAC, etc.), ácido fenilborónico (PBA)-ligando formando un complejo con ácido salicilhidroxámico (SHA) y enlaces acrílicos que permiten la polimerización con monómeros de ácido acrílico libres para formar poliacrilamida, o la reacción con superficies de silano o SH. Más específicamente, la inmovilización de proteínas puede efectuarse a través de agentes de unión seleccionados del grupo que comprende bromuro de cianógeno, succinimidas, aldehídos, cloruro de tosilo, avidina-biotina, agentes fotorreticulables incluyendo agentes reticulantes heterobifuncionales tales como éster de *N*-[ $\gamma$ -maleimidobutiriloxisuccinimida] (GMBS), epóxidos y maleimidas. Los anticuerpos pueden unirse a un soporte poroso por entrecruzamiento químico de un grupo amino libre en el anticuerpo con grupos laterales reactivos presentes dentro del soporte. Por ejemplo, los anticuerpos pueden entrecruzarse químicamente con un soporte que contenga grupos amino, carboxilo o azufre libres usando glutaraldehído, carbodiimidas o agentes heterobifuncionales tales como GIVMS como entrecruzantes.

20 **[0067]** Por consiguiente, en una realización de la presente invención se proporcionan métodos en los que los sustratos se inmovilizan en la superficie interna de canales dentro un soporte sólido que lo atraviesan.

30 **[0068]** Los sustratos pueden inmovilizarse en un soporte sólido dentro de regiones espacialmente predefinidas, es decir, dentro de puntos particulares. Las expresiones "región predefinida" o "punto" se refieren a posiciones abordables espacialmente individualmente en un soporte sólido.

#### Detección

35 **[0069]** Pueden detectarse interacciones de enzima-sustrato de varias formas. Las interacciones de enzima-sustrato pueden incluir un acontecimiento de unión que puede visualizarse por detección de la molécula de sustrato que puede ser una proteína marcada. Dicha proteína puede marcarse directamente o indirectamente, por ejemplo, con un anticuerpo o un colorante, etc. Como alternativa, un acontecimiento de reacción puede visualizarse por generación de fluorescencia próxima al lugar en el que tiene lugar la interacción (FRET, eliminación de la extinción (tal como con sondas fluorescentes moleculares)). Además, la detección puede ser por generación de una señal por acción enzimática o reducción de la intensidad de la señal por la presencia de un compuesto no unido (principio de competición).

40 **[0070]** Son bien conocidos por los expertos en la materia medios para detectar señales en general. Por lo tanto, por ejemplo, los radiomarcadores pueden detectarse usando una película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan típicamente proporcionando a la enzima un sustrato enzimático y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan por visualización simple del marcador coloreado. Son medios de detección adicionales, por ejemplo, (micro)-calorimetría y microscopía (óptica).

45 **[0071]** La detección útil particular de interacciones de enzima-sustrato dentro de los métodos de la presente invención es por microscopía de luminiscencia o fluorescencia, microscopía óptica normal, microscopía electrónica, electroquimioluminiscencia (SCL), absorbancia UV/VIS, microcalorimetría y radiometría. Dicha microscopía de fluorescencia puede ser fluorescencia de resolución temporal y espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS).

50 **[0072]** De forma similar a la fluorescencia, también la fosforescencia proporciona un medio de detección adecuado. La fosforescencia se refiere a un estado de excitación de electrones casi estable que implica un cambio del estado del espín (cruzamiento intersistema) que decae sólo lentamente. Es similar a la fluorescencia, pero la especie se excita hasta un estado metaestable desde el que se prohíbe una transición al estado inicial.



[0073] La detección de interacciones de enzima-sustrato también puede lograrse mediante prácticas de detección multietapa. Dichas prácticas pueden ser, a modo de ejemplo y no como limitación, ensayos de tipo sándwich como se conocen bien en la técnica y conversiones enzimáticas en un producto detectable.

5 [0074] La presente invención también contempla el control de más de una interacción de enzima-sustrato (es decir, múltiple), por ejemplo, observando la fluorescencia a diferentes longitudes de onda usando, por ejemplo, los colorantes CY3 y CY5, o empleando simultáneamente diferentes métodos de detección.

#### Aplicaciones

[0075] Los métodos de acuerdo con la presente invención son útiles en varias aplicaciones.

10 [0076] En una realización, la presente invención proporciona el uso de métodos como se describen en la presente memoria para la exploración de fármacos.

[0077] En otra realización, la presente invención proporciona el uso de métodos como se describen en la presente memoria para evaluar la selectividad enzimática por un sustrato respecto al patrón histológico de una muestra biológica dada.

15 [0078] En otra realización, la presente invención proporciona el uso de métodos como se describen en la presente memoria, para la diferenciación de muestras clínicas basándose en la actividad enzimática en la investigación clínica y el diagnóstico *in vitro*.

#### **EJEMPLOS**

20 [0079] El siguiente ejemplo de la invención es ejemplar y no debería tomarse de ningún modo como limitante.

#### **Ejemplo 1: Ensayo de la actividad quinasa en una muestra biológica conservada con Tissue-Tec®**

25 [0080] Biopsias de cerebro congeladas de pacientes a los que se había diagnosticado que padecían un ependimoma o un astrocitoma se embebieron en un alcohol polivinílico disponible en el mercado, medio de embebimiento basado en polietilenglicol (Tissue-Tek® OTC, Sakura Finetek Europe B.V.), se congelaron de forma instantánea en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Cuando fue necesario, los especímenes congelados se cortaron en secciones de 10 µm usando un criostato. Un subconjunto de las secciones se montaron en portaobjetos de vidrio y se fijaron en acetona durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se tiñeron con hematoxilina/eosina (HE) convencional para investigar las características morfológicas de las biopsias. Otro subconjunto de 6 cortes que representaban aproximadamente 100 µg de material seccionado se lisaron en 50 µl de solución de tampón pipeteando la solución de tampón que contenía las secciones hacia arriba y hacia abajo unas cuantas veces, en la que la solución de tampón comprende TRIS-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, pirofosfato sódico 2,5 mM, beta-glicerofosfato 1 mM, vanadato sódico 1 mM, fluoruro sódico 1 mM, leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml y PMSF 1 mM. Esta solución de tampón estaba recién preparada antes del uso. El material lisado se centrifugó posteriormente a alta velocidad durante 10 minutos a 4°C para eliminar los residuos. El sobrenadante se congeló a -80°C.

35 [0081] Se usaron 5 µl del lisado (que representaban aproximadamente 10 µg) para la incubación en una micromatriz de flujo continuo (PamChip®96, PamGene International B.V., Países Bajos), añadiéndolo a una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EGTA 1 mM, DTT 2 mM, detergente Brij35 al 0,01% (Nº Cat. Sigma 430AG-6), BSA 1\* (a partir de BSA 100\*. New England Biolabs, Nº cat. B9001S), ATP 400 µM (Nº Cat. Sigma A7699) y 0,25 µl de un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina conjugado con FITC (Exalpha, Nº cat. X1017, 1 mg/ml) en hielo, y añadiendo esta mezcla inmediatamente a una PamChip®96. La micromatriz contenía 144 péptidos de 16 aminoácidos que representan diversos motivos de reconocimiento de tirosina quinasa.

45 [0082] La reacción enzimática evaluada se refería a la adición de un grupo fosfato a los péptidos en la micromatriz por las quinasas presentes en la mezcla. La mezcla de reacción se incubó dinámicamente por flujo de la mezcla hacia arriba y hacia abajo a través de los poros de la micromatriz durante 60 minutos, un ciclo de flujo hacia arriba y hacia abajo por minuto. La reacción se controló tomando fotografías cada cinco ciclos a la longitud de onda apropiada. Podía discernirse un aumento diferencial en la fosforilación en los diversos péptidos, proporcionando la actividad de diversas quinasas en la mezcla de incubación.

50 [0083] Los patrones de fosforilación resultantes se correlacionaron con las características biológicas determinadas con la tinción con HE convencional.

## REIVINDICACIONES

1. Método para correlacionar la histología y la actividad quinasa de una muestra biológica, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (i) proporcionar una muestra biológica crioconservada, en donde dicha muestra comprende una serie de secciones cortadas consecutivas;
- (ii) obtener los datos histológicos de un primer subconjunto de secciones de dicha serie de secciones;
- (iii) lisar un segundo subconjunto de secciones de dicha serie de secciones para obtener un lisado donde se conservan actividades enzimáticas específicas;
- 10 (iv) ensayar el lisado de la etapa (iii) para determinar la actividad quinasa con uno o más sustratos enzimáticos que comprenden secuencias de aminoácidos inmovilizadas en una micromatriz; y
- (v) correlacionar la histología y la actividad quinasa de la muestra biológica.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha muestra biológica de la etapa (i) se trató con un crioconservante.
- 15 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho crioconservante es un compuesto OCT (Temperatura de Corte Óptima).
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho sustrato comprende secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que incluye péptidos, proteínas, enzimas, receptores de hormonas, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo y haptenos.
- 20 5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha micromatriz es un soporte sólido de flujo continuo tridimensional que comprende canales que lo atraviesan.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichos sustratos se inmovilizan en la superficie interna de los canales dentro del soporte sólido que lo atraviesan.
- 25 7. Método de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, en el que dicho soporte sólido es un soporte de un óxido de metal.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho soporte de óxido de metal es un soporte de óxido de aluminio.
9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho ensayo del lisado para la reacción enzimática con uno o más sustratos es por incubación dinámica, en el que dicha incubación dinámica comprende someter el soporte poroso a al menos un ciclo de flujo del lisado hacia delante y hacia atrás a través de los canales que lo atraviesan.
- 30 10. Uso de un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la diferenciación de muestras clínicas basándose en la actividad enzimática en la investigación clínica y el diagnóstico *in vitro*.
- 35 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, para el cribado de fármacos.

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.*

5

**Documentos de patente citados en la descripción**

\* WO 9902266 [0057]