



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 044**

51 Int. Cl.:
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06773306 .3**
96 Fecha de presentación : **15.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1907854**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales, líneas de células de hibridoma, métodos y kits para detectar fitasa.**

30 Prioridad: **24.06.2005 US 693818 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.09.2011

73 Titular/es: **AB ENZYMES GmbH**
Feldbergstrasse 78
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es: **Yarnall, Michele, Susan y**
Zeitouni, Lilian

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 365 044 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

Anticuerpos monoclonales, líneas de células de hibridoma, métodos y kits para detectar fitasa

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud de patente provisional de EE.UU 60/693.818, presentada el 24 de junio de 2005.

Campo de la invención

- 10 Esta invención se refiere al campo de la inmunología y, más específicamente, se refiere a anticuerpos monoclonales, métodos de inmunoensayo, incluidos ensayos ELISA y de inmuntiras, kits y reactivos, para la detección de la fitasa Quantum™ (Nov9X). La invención se refiere, además a líneas de células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales anti-fitasa Quantum™ (Nov9X), que son DSM ACC 2698, DSM ACC 2701 o DSM ACC 2715.

- 15 Antecedentes de la invención

- 20 Existe una necesidad importante de un ensayo conveniente y relativamente sencillo para detectar la presencia de fitasa en alimentos para animales. Existe también una tremenda necesidad de determinar si una planta ha sido genéticamente modificada o si el grano o alimentos procesados contienen rasgos de GMO (organismos genéticamente modificados). La necesidad requiere métodos de ensayo que puedan detectar y cuantificar el nuevo ADN o la proteína. El documento no patente de Golovan Serguei P. et al., Nature Biotechnology, 2001, 19, 741-745 describe un anticuerpo monoclonal contra fitasa de *E. coli*, utilizado para detectar dicho antígeno en la saliva de cerdos transgénicos utilizando técnicas de inmunocitoquímica. El documento de patente US 2005/0009116 A1 describe anticuerpos policlonales contra fitasa de *E. coli* que reconocen la fitasa Quantum™, pero que también reaccionan de forma cruzada con otras fitasas. La presente invención cumple esta necesidad al proporcionar anticuerpos monoclonales, líneas de células de hibridoma, métodos inmunológicos, reactivos y kits para la detección y cuantificación de fitasa Quantum™ (Nov9X).

- 30 Sumario de la invención

- 35 Se proporcionan métodos, kits y reactivos para detectar y medir la fitasa Quantum™ (Nov9X) en una muestra. La fitasa se produce en diversos microorganismos que incluyen, pero no se limitan a *Escherichia coli*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia pastoris*, o en plantas, que incluyen, pero no se limitan a maíz, trigo, arroz, colza y alfalfa, por ejemplo. En particular, la fitasa se detecta en los alimentos o en plantas genéticamente modificadas que contienen un gen que codifica la proteína. Los alimentos son alimentos para animales. Los alimentos para animales pueden ser para animales monogástricos o rumiantes. Los alimentos pueden ser alimentos machacados y alimentos en gránulos.
- 40 Los reactivos incluyen proteína purificada y anticuerpos específicos para la fitasa Quantum™ (Nov9X). La proteína fitasa se puede aislar a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli* y se puede administrar a animales para producir anticuerpos policlonales o monoclonales. Alternativamente, la proteína se puede aislar a partir de un extracto de células soluble tal como un extracto de células de *E. coli*.

- 45 Los anticuerpos tienen una elevada sensibilidad y especificidad por la fitasa Quantum™ (Nov9X) y son útiles en métodos de inmunoensayo para la detección de fitasa Quantum™ (Nov9X) enzimáticamente activa en animales o en organismos genéticamente modificados.

- 50 Los métodos son inmunoensayos que emplean los anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria y son capaces de detectar bajas concentraciones de fitasa Quantum™ (Nov9X). Los anticuerpos se purifican y, por lo tanto, reaccionan mínimamente con otras proteínas que pueden estar presentes en la muestra. Los anticuerpos y/o proteínas están reunidos en un kit con reactivos de inmunoensayo convencionales para la detección de la fitasa Quantum™ (Nov9X).

- 55 A la vista de lo anterior, existe una necesidad real del desarrollo de tecnología que permita la identificación de fitasa Quantum™ (Nov9X) en muestras.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica que muestra una curva patrón para la actividad de fitasa.

- 5 La Figura 2 es una gráfica que muestra el porcentaje de actividad relativa frente al tiempo de incubación a 99°C de la enzima fitasa tanto en un ensayo ELISA como en un ensayo de actividad enzimática. La detección de la enzima fitasa en el ELISA es análoga a la cantidad de actividad detectada en el ensayo de actividad enzimática.

- 10 La Figura 3 es una reproducción escaneada de tests de inmunitiras que muestran la detección de fitasa (flecha) después de incubación a 99°C hasta durante una hora. Después de aproximadamente 20 minutos a 99°C se observa una disminución en la detección de fitasa.

- 15 La Figura 4 es una descripción de un kit de test de inmunoensayo a modo de ejemplo y el método de utilizar el mismo.

- 20 Las Figuras 5A-C, son una serie de tres inmunitiras que muestran una comparación del revestimiento de anticuerpos monoclonales anti-fitasa y su capacidad para detectar fitasa de muestras de ensayo de alimentos en grano que contienen fitasa a concentraciones de 0 U/kg; 250 U/kg; o 500 U/kg. La Figura 5A muestra las tres inmunitiras con nitrocelulosa, revestidas con anticuerpos PHY46 monoclonales en calidad del anticuerpo de revestimiento; la Figura 5B muestra los tres inmunitiras con nitrocelulosa, revestidas con PHY36 monoclonal en calidad del anticuerpo de revestimiento y la Figura 5C muestra las inmunitiras con nitrocelulosa, revestidas con PHY37 monoclonal en calidad del anticuerpo de revestimiento. Para la detección de todas las inmunitiras se utilizó PHY34 monoclonal conjugado con oro.

- 25 La Figura 6 es una comparación de ensayos de inmunitira de fitasa utilizando anticuerpos anti-fitasa monoclonales (fila superior) o anticuerpos anti-fitasa policlonales (fila inferior). Muestras de enzima fitasa en las pistas de muestra eran: pista 9 - Ronozyme®; pista 10 - Phyzyme®; pista 11 - Natuphos®; y pista 12 - fitasa Quantum™.

- 30 La Figura 7 es una curva patrón de fitasa presente en muestras testadas utilizando un ELISA de anticuerpos monoclonales.

- 35 Las Figuras 8A-K muestran las etapas para el ELISA de fitasa Quick Quantum™. Figura 8A - moler 300 g de alimentos en un molinillo de café; 8B – añadir 80 ml de tampón de extracción a 20 g de muestra; 8C – agitar vigorosamente durante 1 minuto; 8D – dejar reposar el recipiente durante 30 minutos; 8E – montar la placa y los reactivos y llevar hasta temperatura ambiente; 8F – añadir 50 µl de controles o muestras a los pocillos; 8G – añadir 50 µl del conjugado a los pocillos e incubar durante 30 minutos; 8H – lavar los pocillos 5 veces con agua destilada; 8I – añadir 100 µl de sustrato a los pocillos e incubar durante 15 minutos; 8J – interpretar los resultados visualmente o leerlos a 650 nm en un lector de placas, y 8K – muestra los resultados representativos.

- 40 Descripción detallada de las realizaciones descritas

- 45 En esta memoria se describen métodos, kits y reactivos para la detección de fitasa Quantum™ (Nov9X) en una muestra. También se describen líneas de células monoclonales que producen anticuerpos monoclonales anti-fitasa.

La metodología de la invención se puede utilizar para detectar cualquier enzima en muestras tales como alimentos para animales. Se conoce un cierto número de fitasas.

- 50 Fitasas conocidas incluyen, pero no se limitan a las descritas en el documento WO 01/90333, titulado "Recombinant Bacterial Phytases and Uses Thereof"; documento WO 99/08539 titulado, "Novel Phytase"; publicación de solicitud de EE.UU. n° 20030157646, titulada "Microbially Expressed Thermotolerant Phytase For Animal Feed", y publicación de solicitud de EE.UU. n° 20030170293, titulada "Thermotolerant Phytase for Animal Feed".

- 55 Cuando se realizan inmunoensayos para detectar fitasa Quantum™ (Nov9X) en plantas transgénicas y en los productos producidos a partir de ellas (incluidas fracciones de alimentos), es importante que un ensayo tenga la

capacidad de detectar la proteína específica. Así, son muy importantes anticuerpos muy específicos para el desarrollo de productos comerciales de éxito.

Los reactivos son fitasa Quantum™ (Nov9X) antigénica y anticuerpos anti-fitasa Quantum™ (Nov9X) que son muy específicos para la fitasa Quantum™ (Nov9X). El método es un inmunoensayo para la detección sensible y específica de fitasa Quantum™ (Nov9X) específicamente para la detección de fitasa Quantum™ (Nov9X) en alimentos para animales y en plantas tratadas mediante ingeniería tales como productos agrícolas. El kit contiene los anticuerpos anti-fitasa Quantum™ (Nov9X) descritos en esta memoria y otros reactivos, particularmente los utilizados en un formato de ensayo de tira, para uso en el inmunoensayo descrito en mayor detalle a continuación.

Proteína antigénica

Para la preparación de proteína recombinante tal como fitasa Quantum™ (Nov9X), después de la transformación de una cepa hospedante adecuada y del crecimiento de la cepa hospedante hasta una densidad de células apropiada, p. ej. un hospedante bacteriano, insecto o levadura, se puede inducir a un promotor seleccionado por medios apropiados (p. ej. desplazamiento de temperatura o inducción química) y se pueden cultivar células durante un período adicional para proporcionar enzimas recombinantes. Después, las células se recolectan típicamente, mediante centrifugación, se interrumpe por medios físicos o químicos y el extracto bruto resultante se conserva para la purificación ulterior.

Células microbianas empleadas en la expresión de proteínas se pueden interrumpir por cualquier método conveniente, incluido ciclos de congelación – descongelación, tratamiento mediante ultrasonidos, interrupción mecánica o el uso de agentes de lisado de células, siendo métodos de este tipos bien conocidos por los expertos en la técnica.

La enzima fitasa se recupera y purifica a partir de cultivos de células recombinantes por métodos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácidos, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lectina. Se pueden utilizar, según sea necesario, etapas de replegamiento de proteínas para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, para las etapas de purificación finales se pueden emplear cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC – siglas en inglés).

Anticuerpos

Anticuerpos útiles en la invención se pueden preparar utilizando un conejo, pollo, ratón o una cabra. El programa para la inoculación no es crítico y puede ser cualquiera normalmente utilizado para este fin en la técnica. Procesos de este tipo se describen, por ejemplo, en *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, páginas 92-115.

Los anticuerpos preferidos para la detección de fitasa Quantum™ (Nov9X) son anticuerpos de conejo, anticuerpos de pollo y anticuerpos de cabra que están purificados por inmunoafinidad contra fitasa recombinante producida en cuerpos de inclusión de E. coli o anticuerpos monoclonales de ratón. Para detectar y cuantificar fitasa Quantum™ (Nov9X), los anticuerpos se marcan, preferiblemente de forma directa, utilizando marcadores que incluyen enzimas, radioisótopos y partículas coloreadas tales como perlas de látex u oro coloidal. En otra realización, los anticuerpos se marcan de forma indirecta, por ejemplo mediante reacción con sustancias marcadas que se unen al anticuerpo tales como anticuerpos secundarios, proteína A o proteína G.

Anticuerpos policlonales

Métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la técnica. Anticuerpos policlonales pueden desarrollarse en un animal, por ejemplo mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyecta en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante incluye la enzima de alimentación o proteína de fusión de la misma. Por ejemplo, el agente es el polipéptido fitasa o una proteína de fusión de la misma.

Ejemplos de adyuvantes incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización se puede seleccionar por un experto en la técnica sin una experimentación excesiva. Los anticuerpos preferidos son muy sensibles para la detección de proteínas fitasa, por ejemplo proteínas fitasa transgénicas a concentraciones relevantes en muestras a granel de cereales vendidos a granel en el canal de distribución. Preferiblemente, los anticuerpos detectan la proteína fitasa a una elevada sensibilidad de aproximadamente 0,059 ng/ml. Anticuerpos de elevada sensibilidad son útiles para la detección de bajas concentraciones de proteínas fitasa en tejidos de cultivos tratados genéticamente tales como, pero no limitadas a hojas, tallos, semillas, peciolo, raíces y similares, o productos derivados de cultivos de este tipo tales como fracciones de alimentos o alimentos para animales.

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos anti-fitasa Quantum™ (Nov9X) eran anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se prepararon utilizando métodos de hibridoma tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal hospedante apropiado se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para inducir a que linfocitos produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

Los anticuerpos monoclonales de la invención se prepararon de acuerdo con la descripción del Ejemplo 6. Las líneas de célula de hibridoma se depositaron el 3 de noviembre de 2004 y el 2 de febrero de 2005 (tal como se indica más abajo), de acuerdo con el Tratado de Budapest en la DSZM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124, Braunschweig, Alemania. A las líneas de células se les han asignado los siguientes números de acceso:

Cultivo de células PHY34	DSMACC2698	Depósito 3/11/04
Cultivo de células PHY36	DSMACC2699	Depósito 3/11/04 (referencial)
Cultivo de células PHY37	DSMACC2700	Depósito 3/11/04 (referencial)
Cultivo de células PHY46	DSMACC2701	Depósito 3/11/04
Cultivo de células Phytase	DSMACC2715	Depósito 2/2/05.
Mab 28		

Las líneas de células monoclonales de la invención se prepararon de acuerdo con la descripción en el Ejemplo 6 que figura más abajo.

El agente inmunizante incluye, típicamente, el polipéptido deseado o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se utilizan linfocitos de la sangre periférica ("PBLs" – siglas en inglés), si se desean células de origen humano, o se utilizan células del bazo o células del nódulo linfático si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Después, los linfocitos se fusionan con una línea de células inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986), págs. 59-103). Líneas de células inmortalizadas son, habitualmente, células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean líneas de células de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células no fusionadas e inmortalizadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluye típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Líneas de células inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan un nivel de expresión elevado estable de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Líneas de células inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murinas que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. y del

American Type Culture Collection, Manassas, Va. Líneas de células de mieloma humanas y de heteromieloma de ratón – humanas también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987, págs. 51-63).

5 El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se somete entonces a ensayo en cuanto a la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra PRO. Preferiblemente, la especificidad de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo in vitro tal como radio-inmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
10 Técnicas y ensayos de este tipo son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

15 Después de haber identificado las células de hibridoma deseadas, los clones se subclonan mediante procesos de dilución limitantes y se hacen crecer por métodos convencionales (Goding, más arriba). Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se hacen crecer *in vivo* como ascitis en un mamífero. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se aíslan o purifican a partir del medio del cultivo o del fluido de ascitis por procesos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A- Sepharosa, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

20 Anticuerpos monoclonales también se preparan por métodos de ADN recombinante tal como los descritos en la patente de EE.UU. nº 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla fácilmente y se secuencía utilizando procesos convencionales (p. ej. utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos).
25 Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de ADN de este tipo. Una vez aislado, el ADN se coloca en vectores de expresión que luego se transfectan en células hospedantes tales como células COS de simios, células del ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen, de otro modo, proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedantes recombinantes. El ADN se modifica también, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. nº 4.816.567; Morrison et al., más arriba), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina. Un polipéptido no inmunoglobulina de este tipo está sustituido para los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o está sustituido para los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo de la
30 invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

35 En otra realización, los anticuerpos son anticuerpos monovalentes. Métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera de inmunoglobulina y de la cadena pesada modificada. La cadena pesada está truncada generalmente en cualquier punto en la región Fc con el fin de prevenir una reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos cisteína relevantes están sustituidos con otro residuo aminoácido o están suprimidos con el fin de evitar una reticulación. Métodos *in vitro* son también adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, se puede conseguir utilizando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

45 Otros métodos conocidos en la técnica incluyen el método de Kearney, et al., J. Immunol. 123:1549-1558 (1979) que se incorpora en esta memoria como referencia. En síntesis, animales tales como ratones o conejos se inoculan con el inmunógeno en adyuvante, y se recolectan células del bazo y se mezclan con una línea de células de mieloma. Se induce a que las células se fusionen mediante la adición de polietilenglicol. Hibridomas se seleccionan químicamente extendiendo en placas las células en un medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Subsiguientemente, los hibridomas se rastrean en cuanto a su capacidad de producir anticuerpos anti-fitasa Quantum™ (Nov9X) monoclonales. Anticuerpos productores de hibridomas se clonan, expanden y se almacenan congelados para la futura producción.

55 En otra realización, el anticuerpo se marca directamente con un marcador detectable para la identificación y cuantificación de una proteína fitasa Quantum™ (Nov9X). Marcadores para uso en inmunoensayos son

generalmente conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromógenas, incluidas partículas coloreadas tales como oro coloidal y perlas de látex.

5 Alternativamente, los anticuerpos se marcan indirectamente mediante reacción con sustancias marcadas que tienen una afinidad por inmunoglobulina tal como proteína A o G o segundos anticuerpos. Los anticuerpos se conjugan con una segunda sustancia y se detectan con una tercera sustancia marcada que tiene una afinidad por la segunda sustancia conjugada al anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se conjuga a biotina, y el conjugado anticuerpo – biotina se detecta utilizando avidina o estreptavidina marcada.

10 En otra realización, el anticuerpo se conjuga a un hapteno, y el conjugado de anticuerpo – hapteno se detecta utilizando anticuerpo anti–hapteno marcado. Estos y otros métodos de marcar anticuerpos y conjugados de ensayo son bien conocidos por los expertos en la técnica.

15 Inmunoensayo

Los anticuerpos se reúnen colectivamente en un kit con reactivos de inmunoensayo convencionales para la detección de la fitasa Quantum™ (Nov9X) utilizando el inmunoensayo descrito más abajo. El kit puede contener, opcionalmente, tanto anticuerpos monoclonales como policlonales y un patrón para determinar la presencia de la fitasa Quantum™ (Nov9X) en una muestra. El kit que contiene estos reactivos proporciona una detección del lugar simple y rápida de la proteína.

Los anticuerpos descritos anteriormente se utilizan como reactivos básicos de un cierto número de diferentes inmunoensayos para determinar la presencia de la fitasa Quantum™ (Nov9X) en una muestra. Los anticuerpos se emplean en cualquier tipo de inmunoensayo, ya sea cualitativo o cuantitativo.

En un ensayo de sándwich cuantitativo típico, existen tres partes básicas. Por ejemplo, en un ensayo de este tipo para la fitasa Quantum™ (Nov9X), la proteína fitasa Quantum™ (Nov9X) en un extracto vegetal o extracto de alimentos genéticamente modificado, tal como pienso para pollos, se captura sobre la fase sólida utilizando un anticuerpo primario. Después, se forma un “sándwich” entre el anticuerpo primario, la proteína fitasa Quantum™ (Nov9X) y el anticuerpo secundario que ha sido añadido al pocillo. En una realización, el anticuerpo secundario es un anticuerpo anti–fitasa de cabra. Después de una etapa de lavado, en la que se ha eliminado anticuerpo secundario no unido, el anticuerpo secundario unido se detecta utilizando un anticuerpo marcado. En una realización particular, el anticuerpo de detección es un anticuerpo anti–cabra de burro marcado con fosfatasa alcalina. Se añade sustrato para la detección de la enzima, fosfatasa alcalina, y el desarrollo de color se mide leyendo la absorbancia de cada pocillo. La curva patrón utiliza un ajuste de la curva de cuatro parámetros para representar las concentraciones frente a la absorbancia.

Más generalmente, el inmunoensayo para la detección de fitasa Quantum™ (Nov9X) comprende las etapas de: a) preparar un extracto de la muestra; b) incubar una porción del extracto con un anticuerpo anti–fitasa Quantum™ (Nov9X) primario que se une a la fitasa Quantum™ (Nov9X), estando unido el anticuerpo primario a un soporte sólido, y un anticuerpo anti–fitasa secundario que se une a la fitasa para crear un complejo anticuerpo–fitasa–anticuerpo; c) lavar el complejo anticuerpo–fitasa–anticuerpo para separar el anticuerpo secundario no unido; d) añadir un anticuerpo de detección que reacciona inmunológicamente con el anticuerpo secundario, en donde el anticuerpo de detección está marcado; y e) medir la cantidad de anticuerpo marcado unido para determinar la concentración de la fitasa.

En otra realización de la invención, el marcador detectable es una enzima. En realizaciones más preferidas, la enzima es fosfatasa alcalina, peroxidasa o β -galactosidasa. En otra realización, la enzima proporciona un producto de reacción soluble. La invención proporciona también un kit para la detección y cuantificación por el método de inmunoensayo, que comprende: a) medios para extraer la fitasa Quantum™ (Nov9X) de una muestra; b) un soporte sólido que comprende un anticuerpo anti–fitasa Quantum™ (Nov9X) primario unido al soporte sólido; c) un anticuerpo anti–fitasa secundario; y d) un anticuerpo de detección capaz de unirse inmunológicamente al anticuerpo secundario, y en donde el anticuerpo de detección está marcado con medios de detección.

En una realización particular, los medios de detección son una enzima. En realizaciones particulares, la enzima de

detección es fosfatasa alcalina, peroxidasa o β -galactosidasa. En otra realización, la enzima proporciona un producto de reacción soluble o uno insoluble. En otra realización, el kit comprende, además, un sustrato para la enzima. A inmunoensayos de este tipo se les alude también como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA).

5 Los anticuerpos descritos anteriormente se emplean también en un inmunoensayo cualitativo para la detección de una fitasa Quantum™ (Nov9X). A un ensayo de este tipo se le alude comúnmente como una inmunotira. Una inmunotira se produce utilizando membranas y filtros, a través de los cuales se extrae una muestra de líquido mediante la acción capilar. La fitasa Quantum™ (Nov9X) en la muestra reacciona con los anticuerpos contenidos en la inmunotira a medida que ésta se desplaza a lo largo de la tira. Para detectar la proteína fitasa en piensos para pollos, los piensos se lavan con un tampón, se separan del material sólido y se añaden a la inmunotira. A medida que la muestra de líquido migra al extremo opuesto de la inmunotira, la fitasa Quantum™ (Nov9X) reacciona con los anticuerpos específicos y se captura en una línea que se vuelve visible. La detección de la señal en la línea de ensayo indica que fitasa Quantum™ (Nov9X) se encuentra en la muestra.

15 En una realización, la invención proporciona un inmunoensayo para la detección de fitasa Quantum™ (Nov9X) en una muestra, que comprende las etapas de: a) preparar un extracto de la muestra en presencia de un anticuerpo primario que reconoce inmunológicamente a la fitasa Quantum™ (Nov9X) en el extracto, de modo que se forma un complejo anticuerpo primario-fitasa; b) preparar un formato en fase sólida que tiene una medición significativa en tres dimensiones para formar un volumen sustancial con una pluralidad de espacios intersticiales uniéndolo a un anticuerpo secundario deseado, capaz de reconocer inmunológicamente a la fitasa, y en donde el anticuerpo secundario se conjuga a medios de detección y en donde el anticuerpo secundario reconoce también inmunológicamente a la fitasa; d) combinar el extracto de la etapa (a) con el formato preparado de la etapa (b), con lo que el extracto se extrae a través de los espacios intersticiales del formato en fase sólida preparado capturando el complejo anticuerpo primario-fitasa; e) detectar fitasa por la presencia de dicho complejo anticuerpo primario-fitasa capturado.

20 En otras realizaciones, el formato en fase sólida es acetato de celulosa, celulosa, nitrocelulosa o nilón. En otra realización, el formato en fase sólida está constituido por múltiples capas apiladas y contiguas, en donde cada una de las capas es capaz de capturar una enzima de alimentación diferente. En una realización preferida, el soporte en fase sólida comprende, además, una almohadilla de absorción de muestras del formato en fase sólida. En una realización más preferida, el inmunoensayo comprende, además, una tira que comprende un anticuerpo anti-enzima de alimentación marcado.

25 En una realización particular, los medios de detección son oro coloidal.

30 Se proporciona también un inmunoensayo muy sensible que emplea los anticuerpos descritos anteriormente. El ensayo es útil para la detección de una enzima fitasa Quantum™ (Nov9X) en una muestra de alimentos. También, el ensayo es útil para la detección de organismos genéticamente modificados que han sido tratados mediante ingeniería para incluir un gen que codifica un gen de fitasa Quantum™ (Nov9X). El inmunoensayo es capaz de detectar bajas concentraciones de la proteína en muestras, tales como alimentos para animales, y en muestras de cultivos genéticamente mejoradas.

35 Tal como se ha descrito antes, los anticuerpos utilizados en el inmunoensayo son inmunorreactivos con epítomos o un epítomo común en la proteína fitasa, expresados por diversos microorganismos y que reaccionan mínimamente con otras proteínas que pueden estar presentes en la muestra, proporcionando así una determinación precisa de la presencia de un organismo genéticamente modificado en una muestra tal como una muestra de cereales.

40 El inmunoensayo es útil para detectar la presencia o cantidad de una fitasa Quantum™ (Nov9X) en una diversidad de muestras, incluidos alimentos para animales y muestras agrícolas tales como material vegetal. La muestra se puede obtener a partir de cualquier fuente en la que la proteína deseada sea accesible al anticuerpo. Por ejemplo, la muestra puede ser cualquier tejido o extracto vegetal incluidos raíces, tallos, peciolo, hojas o semillas, o productos derivados de tales cultivos tales como fracciones de alimentos.

45 Uno o más de los anticuerpos descritos anteriormente se emplean en cualquier inmunoensayo heterogéneo u homogéneo, en sándwich o competitivo, para la detección de proteína fitasa Quantum™ (Nov9X). El anticuerpo

está marcado con una etiqueta detectable o está acoplado a una fase sólida. Métodos para acoplar anticuerpos a fases sólidas son bien conocidos por los expertos en la técnica. De acuerdo con el método del inmunoensayo, la muestra que contiene fitasa Quantum™ (Nov9X) se hace reaccionar con el anticuerpo durante un tiempo suficiente bajo condiciones que fomenten la unión del anticuerpo a la proteína fitasa Quantum™ (Nov9X) en la muestra. Se comprenderá por parte de los expertos en la técnica que los reactivos de inmunoensayo y la muestra pueden reaccionar en diferentes combinaciones y órdenes. Se emplean medios físicos para separar reactivos unidos a la fase sólida a partir de reactivos no unidos tales como filtración de partículas, decantación de disoluciones de reacción a partir de tubos o pocillos revestidos, separación magnética, acción capilar, y otros medios conocidos por los expertos en la técnica. Se comprenderá también que en el método puede incluirse un lavado separado de la fase sólida.

La concentración de la proteína fitasa Quantum™ (Nov9X) en la muestra se determina comparando la intensidad del color producido por la muestra con una tarjeta de colores, utilizando un reflectómetro, o utilizando un espectrofotómetro o lector de placas de microtitulación.

La mezcla de reacción resultante, o combinación de anticuerpo y muestra, se prepara en una disolución que utiliza la cinética de unión de anticuerpo – fitasa Quantum™ (Nov9X). Una disolución apropiada es una disolución acuosa o tampón. La disolución se proporciona preferiblemente bajo condiciones que fomentarán la unión específica, minimizarán la unión no específica, solubilizarán la enzima de alimentación, estabilizarán y conservarán la estabilidad del reactivo, y pueden contener tampones, detergentes, disolventes, sales, agentes quelantes, proteínas, polímeros, hidratos de carbono, azúcares y otras sustancias conocidas por los expertos en la técnica.

La disolución de la mezcla de reacción se hace reaccionar durante un tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo reaccione y se una a la proteína fitasa Quantum™ (Nov9X) para formar un complejo anticuerpo–fitasa. Se desea que el tiempo más corto de reacción que resulta en la unión minimice el tiempo requerido para completar el ensayo. Un período de tiempo de reacción apropiado para un test de inmunotira es menor que o igual a 10 minutos o entre aproximadamente un minuto y 10 minutos. Se prefiere un tiempo de reacción menor que cinco minutos. Lo más preferiblemente, el tiempo de reacción es menor que tres minutos. Al optimizar los reactivos, la unión se puede completar sustancialmente a medida que se combinan los reactivos.

La reacción se realiza a cualquier temperatura a la cual los reactivos no se degraden o se vuelvan inactivos. Se prefiere una temperatura entre aproximadamente 18°C y 30°C, y la temperatura de reacción más preferida es la temperatura ambiente o del recinto (aproximadamente 22°C).

Para este inmunoensayo es idealmente adecuado un formato en fase sólida tal como una inmunotira. Tiras de ensayo están constituidas por múltiples componentes porosos, membranas y filtros, a través de los cuales la muestra de líquido se extrae mediante la acción capilar. La fitasa Quantum™ (Nov9X) en la muestra reacciona con los reactivos de ensayo contenidos dentro de la tira de ensayo a medida que recorre la longitud de la tira. Para detectar la proteína en el grano o las semillas, el grano se muele formando un polvo y la proteína se extrae del polvo con un líquido que luego se separa del material sólido y se ensaya utilizando el test. El líquido se aplica a la inmunotira, y la proteína fitasa Quantum™ (Nov9X) migra hacia el extremo distal de la tira. A medida que migra descendiendo por la tira, la fitasa Quantum™ (Nov9X) reacciona con reactivos aplicados a o inmovilizados sobre la tira, provocando un producto de señal detectable. La detección de la señal indica la presencia de fitasa Quantum™ (Nov9X) en la muestra.

En una realización, el formato en fase sólida es acetato de celulosa, celulosa, nitrocelulosa o nilón. En una realización preferida, el formato en fase sólida es nitrocelulosa.

En otra realización, el formato en fase sólida comprende una almohadilla de absorción de la muestra, una tira de nitrocelulosa y una almohadilla de fondo que comprende un anticuerpo anti–fitasa marcado.

Ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Los métodos serológicos que se utilizan se basan en las técnicas del ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) que se describen, por ejemplo, en Harlow, E., Lane D., *Antibodies: A Laboratory Manual*. 1998. Cold Spring Harbor Laboratory. págs. 553-612. El método ELISA utilizado en la presente invención se describe en

el Ejemplo de Referencia 1.

Kit de inmunoensayo

5 Un kit de inmunoensayo para la detección de la proteína de enzima de alimentación en una muestra contiene uno o más de los anticuerpos descritos anteriormente. El kit puede contener adicionalmente un equipo para obtener la muestra, un recipiente para contener los reactivos, medios de cronometraje, un tampón para diluir la muestra y un colorímetro, reflectómetro, o patrón, frente al cual se pueda medir un cambio de color. El kit puede incluir los reactivos en forma de una inmutira según se describe anteriormente.

10 En una realización preferida, los reactivos, incluido el anticuerpo, son secos. La adición de la muestra acuosa al vial o tira da como resultado la solubilización del reactivo seco, determinando que reaccione.

15 Los reactivos, métodos de inmunoensayo y kits descritos anteriormente se comprenderán adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Los ejemplos que figuran a continuación muestran protocolos experimentales y reactivos típicos que se pueden utilizar en la detección de fitasa Quantum™ (Nov9X) en muestras tales como materiales de alimentación u otros materiales vegetales. Ejemplos de este tipo se proporcionan a modo de ilustración y no a modo de limitación.

20 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se ha de entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aún cuando indican realizaciones preferidas de la invención, se dan únicamente a modo de ilustración, ya que resultarán evidentes para los expertos en la técnica, a partir de esta descripción detallada, diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención.

25 EJEMPLOS

Estos métodos y materiales describen el proceso general para preparar las muestras de grano o de alimentación y la producción de los anticuerpos policlonales y monoclonales utilizados en los ejemplos descritos a continuación.

30 Materiales y métodos

Muestra de maíz: El extracto de maíz se derivó de semillas Hi II o semillas A188 (no transgénicas) o semillas de fitasa genéticamente modificadas. Se pulverizaron cinco granos utilizando un triturador de tejidos KLECO. La harina de maíz resultante se suspendió en 5 ml de agua destilada para solubilizar las proteínas. El sobrenadante se testó en el ELISA o con las inmutiras.

35 Producción de anticuerpos policlonales

Para inmunización: Después de la inyección inicial, al animal (conejo o cabra) se le da una dosis de refuerzo después de 28 días. Cada dosis de refuerzo subsiguiente después de ello es cada 21 días. Los animales se sangran 10 días después de cada dosis de refuerzo.

40 Para los pollos, la primera dosis de refuerzo es 7 días después de la inyección inicial, seguida de dosis de refuerzo cada 28 días. Los pollos se sangran 10 días después de cada dosis de refuerzo y, si se detecta un buen título de anticuerpos, se recogen los huevos puestos después de cada dosis de refuerzo.

45 El agente inmunizante era la proteína fitasa completa purificada a partir de un sistema de expresión de *E. coli*. Con la primera inyección en el animal, la proteína se emulsiona en adyuvante completo de Freund. Las dosis de refuerzo se realizan en adyuvante incompleto de Freund. Los animales utilizados para producir los anticuerpos policlonales son conejos, pollos y cabras.

50 Purificación de fitasa (Nov9X):

55 Fitasa (Nov9X) formulada con sorbitol al 10%, NaCl al 10% y pH 4,2 se dializó durante una noche frente a Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 a 4°C, utilizando el entubado de diálisis MWCO 10 K de SnakeSkin (Pierce, Rockford, IL). Después de la diálisis, se añadió (NH₄)₂SO₄ sólido a la mezcla de fitasas, inicialmente hasta una saturación del 25%, luego hasta el 50% y, finalmente, hasta una saturación del 75% a 0°C. Tras la adición de (NH₄)₂SO₄ hasta una

5 saturación del 25%, la mezcla se agitó durante 30 minutos a 0°C y luego se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 minutos. Al sobrenadante decantado se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta una saturación del 50%, al tiempo que el sedimento se resuspendió en Tris-HCl 25 mM, pH 9,0. Este proceso se llevó a cabo 3 veces, proporcionando gránulos de Nov9X $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de saturación 0-25%, 25-50% y 50-75%. El análisis SDS-PAGE demostró la presencia de Nov9X en la fracción de 50-75%. Esta fracción se dializó frente a Tris-HCl 25 mM, pH 9,0 y se preparó para la purificación por cromatografía en columna.

10 Nov9X TAM bruta procedente del fraccionamiento 50-75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se cargó sobre una columna de intercambio de aniones y HiTrapQ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) utilizando un caudal de 5,0 mL/min. Para eluir Nov9X se utilizó un gradiente lineal de NaCl de 0-0,4 M en Tris-HCl 25 mM, pH 9,0, desarrollado a lo largo de 30 minutos. Se utilizaron mediciones de absorbancia a 280 nm para seguir el progreso de la operación de cromatografía. Después del análisis por SDS-PAGE, se agruparon las fracciones más puras que contenían la Nov9X, se concentraron con un concentrador centrífugo Centricon Plus-20 (Millipore, Bedford, MA), y se cargaron en una columna de exclusión por tamaño 26/60 Sephacryl S100 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) hecha funcionar a 1 mL/min. El tampón eluyente era Tris-HCl 25 mM, pH 9,0. Se agruparon fracciones que contenían Nov9X pura, se concentraron y se dializaron frente a Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 y se utilizaron para los estudios descritos más abajo.

20 EJEMPLO DE REFERENCIA 1: ELISA de fitasa

Este ejemplo describe la detección y medición cuantitativa de la enzima fitasa en una muestra de maíz utilizando la técnica inmunológica ELISA

25 Proceso

30 Las placas de múltiples pocillos (Nunc, Maxisorp) se revistieron a 4°C durante una noche con el anticuerpo anti-fitasa de conejo a una concentración de 2 µg/ml y se diluyeron en borato de sodio/ácido bórico 50 mM, NaCl 75 mM, pH 8,5. Las placas se lavaron cinco veces con Tris 10 mM que contenía Tween-20 al 0,05% y azida de sodio al 0,03% pH 8 (tampón de lavado). Nota: se realizó la misma etapa de lavado después de cada período de incubación para eliminar anticuerpos/muestras no unidos. Después, las placas se bloquearon durante 45 min a la temperatura ambiente con albúmina de suero bovino al 1%, Tween-20 al 0,05%, azida de sodio al 0,03%, NaCl 150 mM en fosfato de sodio 100 mM, pH 7,4 (diluyente). Cincuenta microlitros de cada muestra se añadieron a la placa y se incubaron durante 1,5 h a la temperatura ambiente. El anticuerpo anti-fitasa de cabra (diluido hasta 2 µg/ml en diluyente) se añadió a las placas y se incubó durante 1 h a 37°C. El anticuerpo de detección (anticuerpo anti-cabra de burro marcado con fosfatasa alcalina se diluyó hasta 1 µg/ml en diluyente), se añadió a las placas y se incubó durante 1 h a 37°C. Se añadió el sustrato, paranitrofenilfosfato (pNPP) y se dejó desarrollar durante 30 min a la temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 405 nm con 492 nm como referencia.

40 Características del ensayo

45 La curva patrón de fitasa era un ajuste de curvas de 4 parámetros (véase la Figura 1). La curva se representó linealmente frente al log con un intervalo de 0,04 a 16 ng/ml. Para representar la curva patrón de 4 parámetros en un eje log X, el patrón de 0 ng/ml debe introducirse en el programa de análisis a razón de 0,01 ng/ml en lugar de 0 ng/ml. El programa de análisis utilizado era el software WinSelect™ para el lector de microplacas Tecan Sunrise™, a pesar de que funciona cualquier programa de ajuste de curvas de cuatro parámetros.

50 La dosis mínima detectable (MDD – siglas en inglés) era el nivel más bajo de proteína fitasa que se distinguía estadísticamente del patrón cero. La dosis mínima detectable se determinó mediante el análisis de 24 réplicas de extracto de semilla de maíz control negativo a 1 mg/ml de proteína total. A la media se añadieron dos desviaciones estándar de la media estándar cero D. O. (límites de confianza de 95%) y se determinó la dosis de este valor D. O. total utilizando una curva patrón. La dosis mínima detectable era 0,044 mg/ml.

55 La precisión entre operaciones se determinó sometiendo a ensayo 4 muestras control diferentes en 21 ensayos diferentes. Las muestras eran fitasa purificada introducida en diluyente del ELISA. Los resultados se recogen más abajo en la Tabla 1. La precisión es buena, menor que 15%, para concentraciones de muestras que se miden en la porción lineal de la curva patrón.

Tabla 1. Test de Precisión entre Operaciones

Muestra	Fitasa media ng/ml	Desviación estándar	% de coeficiente de variación
1	9,65	2,27	23,5%
2	2,99	0,38	12,8%
3	0,94	0,11	12,0%
4	0,39	0,10	25,6%

5 La precisión dentro de cada operación se determinó sometiendo a ensayo 20-24 réplicas de las siguientes muestras. Las muestras eran fitasa introducida en diluyente del ELISA. Los resultados se recogen en la Tabla 2 que figura más abajo. Todas las muestras dieron como resultado una precisión muy buena, indicando una buena reproducibilidad dentro de una operación de ensayo sencilla.

Tabla 2. Test de Precisión dentro de Operaciones

10

Muestra	Fitasa media ng/ml	Desviación estándar	% de coeficiente de variación
1	0,463	0,030	6,44%
2	2,293	0,264	11,51%
3	5,224	0,787	15,07%

15

Cuatro extractos de semillas de maíz se diluyeron con diluyente del ELISA con el fin de testar la linealidad del ensayo. El extracto de maíz se derivó de semillas Hi II o semillas A188 (no transgénicas) o semillas productoras de fitasa genéticamente modificadas. Cinco granos se pulverizaron utilizando un triturador de tejidos KLECO (Visalia, CA). La harina de maíz resultante se suspendió en 5 ml de agua destilada para solubilizar las proteínas. El sobrenadante se testó en el ELISA o con las tiras. El porcentaje de recuperación de fitasa a partir de las muestras diluidas era aceptable.

Tabla 3. Linealidad del Test de Ensayo

20

Muestra	Dilución	Fitasa medida (ng/ml)	Fracción de dilución del valor X medido	Porcentaje de recuperación
A	1/2500	12,76	31900	82%
	1/5000	5,85	29250	75%
	1/10.000	3,90	39000	100%
B	1/2500	6,87	17175	52%
	1/5000	6,90	34500	104%
	1/10.000	3,33	33300	100%
C	1/2500	3,58	8950	63%
	1/5000	2,35	11750	83%
	1/10.000	1,41	14100	100%
D	1/2500	6,11	15275	72%
	1/5000	3,54	17700	83%
	1/10.000	2,13	21300	100%

EJEMPLO DE REFERENCIA 2: Inmuntiras de fitasa

25 Este ejemplo describe el uso de ensayos de inmuntira para testar la presencia de fitasa en una muestra.

Proceso

30 Se prepararon extractos de piensos para pollos machacados añadiendo piensos a un tubo de centrífuga de 50 ml hasta la designación de 15 ml. Esta cantidad de piensos se añadió a una cara del inserto de malla dentro de la

bolsa de extracción. Se añadió el tampón de extracción (25 ml de borato 0,1 M, pH 7,5, que contenía Tween-20 al 0,5%) y el tampón se presionó suavemente sobre los piensos para asegurar que todo el pienso estuviese húmedo. El extracto se incubó a la temperatura ambiente durante al menos 10 min antes de aplicar 3-5 gotas a la inmunotira para el ensayo.

5 Inmunotira

En síntesis, la inmunotira de flujo lateral comprendía una membrana de detección de nitrocelulosa (2,5 x 18 cm) soportada sobre un respaldo de plástico (G&L Precision Die Cutting, Inc. San Jose, CA) en el que se pulverizó una línea de 1 mm de un anticuerpo policlonal anti-fitasa específico de conejo (también se pueden utilizar anticuerpos de pollo). Una línea control de reactivo de anticuerpo anti-cabra de burro se roció en paralelo por encima de la primera línea de anticuerpos. La porción extrema del fondo de la tira de nitrocelulosa se recubre con un trozo de la tira de poliéster. La tira de poliéster se trata primeramente con BSA al 0,5%, poli(alcohol vinílico) al 0,5% y Triton X-100 al 0,1%; tampón fosfato 50 mM, pH 7,4, y el anticuerpo anti-fitasa de cabra conjugado con oro coloidal. La tira de poliéster se deja secar. Después, la tira de poliéster se recubre con una almohadilla de algodón de aplicación de muestras. La almohadilla de aplicación de muestras también se trató previamente con Triton X-100 al 0,1% en tampón borato 0,1 M, pH 8,5, y se dejó secar. Flanqueando el otro extremo o extremo superior de la tira de nitrocelulosa se encuentra otra almohadilla de algodón para absorber la disolución procedente de la muestra después de que pase por encima de las zonas del anticuerpo de ensayo y el anticuerpo control sobre la nitrocelulosa. Después, esta tarjeta completada se cortó en tiras de ensayo de 4 mm para ajustarse a una casete de plástico con una aplicación de muestra ovalada bien situada por encima de la almohadilla de la muestra y una ventana de detección rectangular, situada por encima de la zona de detección de la membrana de nitrocelulosa.

El ensayo se llevó a cabo añadiendo 150 µl (3-5 gotas) de extracto al pocillo de la muestra. Después de esperar aproximadamente 5-10 minutos, los resultados aparecieron en la ventana de resultados. Si en la muestra estaba presente fitasa, aparecía una doble línea roja en la ventana de resultados. La línea inferior indica la presencia de fitasa, mientras que la línea superior es la línea de control que demuestra un funcionamiento adecuado del dispositivo. Si está ausente fitasa, solamente aparece en la ventana de resultados una sola línea de control roja. Véanse las Figuras 3 y 4 para las inmunotiras de muestra. La Figura 3 muestra la detección de la presencia de fitasa. La detección de fitasa disminuye al cabo de 20 minutos según se indica por la flecha, dado que es cuando la fitasa comienza a perder actividad.

Preparación detallada de la inmunotira

35 Tiras de fitasa de 2ª generación – revestimiento de materiales de membrana

Revestimiento de la línea de ensayo: Tarjetas de material absorbente, de 2,25 “ x 180 mm con membrana AE100 se revisten con IAP anti-fitasa de pollo a razón de 0,1 mg/ml en PBS utilizando un pulverizador Camag™ ajustado a un volumen de 18 (1 µl/cm). La tarjeta se coloca sobre una plataforma y la porción de la tarjeta con 2 trozos de papel se coloca muy próxima a la cara frontal del instrumento. La tarjeta se asegura con imanes. Llenar la jeringa con 1,0 mg/ml de IAP anti-fitasa de pollo.

Revestimiento de la línea control: Se utiliza una línea control de anticuerpo anti-cabra de burro como una línea control en la inmunotira. La línea control se pulveriza sobre las tarjetas utilizando un pulverizador Camag™ ajustado al volumen de 18 (1 µl/cm). Las tarjetas se secan a 33°C durante una noche y luego se transfieren a la temperatura ambiente y se almacenan secadas a la temperatura ambiente.

Tiras de fitasa – revestimiento del conjugado sobre poliéster

50 Proceso

El conjugado de oro se diluyó hasta una DO = 50 utilizando una disolución diluyente de oro. Al conjugado de oro se añadieron sacarosa al 20% y trehalosa al 5% para estabilizar el anticuerpo anti-fitasa Nov9X de cabra (0,2 g de sacarosa y 50 mg de trehalosa por 1 ml de conjugado de oro) y se mezcló hasta que se disolvió por completo. Una lámina de poliéster se roció con el anticuerpo anti-fitasa conjugado con oro utilizando un Camag™ a un volumen de 27 (1,5 µl/cm). La lámina de poliéster se colocó sobre la plataforma y se aseguró con los imanes. La lámina se

roció con el conjugado, moviendo 9 mm para cada operación, hasta que se llenó la lámina de poliéster completa. Ocho líneas de conjugado llenarán una lámina. La lámina se secó a 37°C durante 1 h. Después se corta la lámina en tiras de ¼", de modo que la línea de conjugado de oro discurre a lo largo de la parte superior de cada una de las tiras. Almacenar secado a TA.

5

Tiras de fitasa – montaje

Materiales

1. Tarjetas revestidas con anticuerpo IAP anti-fitasa de pollo a razón de 1,0 mg/ml y 1 µl/cm.
- 10 2. Tiras de 5/8" x 180 mm de papel absorbente nº 40 (almohadilla superior)
3. Tiras de ¾" x 180 mm de papel nº 903 tratado con disolución C, pH 8,6 (almohadilla inferior).
- 15 4. Tiras de ¼" x 180 mm de conjugado de oro pulverizado (anti-NOV9X de cabra, DO = 50 a 1,5 µl/cm).

Proceso

Nota: Las tiras se montan en condiciones de menos de una humedad del 40%. Utilizar guantes para aplicar todos los componentes. Se retiran dos láminas de las tiras de pegamento en la parte inferior de la tarjeta. La tira de oro se situó con la línea del conjugado de oro a lo largo de la parte superior y solapando la membrana en 1-1,5 mm. La almohadilla inferior se colocó a lo largo del borde inferior de la tarjeta, teniendo cuidado de dejar la tira de oro expuesta. La lámina se retiró de las tiras de pegamento a lo largo de la parte superior de la tarjeta. Colocar la almohadilla superior a lo largo de la parte superior de la tarjeta solapando la membrana en 1-1,5 mm. Las tarjetas finales se almacenaron secadas a TA hasta que estaban listas para ser cortadas en tiras.

20 Las tiras se cortaron en trozos de 4 mm. Una tarjeta proporcionará ~ 40 tiras. Almacenar las tiras secadas a la temperatura ambiente.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3: Detección de fitasa enzimáticamente activa

30 Proceso

Pichia, que producía fitasa purificada, se inactivó mediante calentamiento hasta 99°C hasta durante 60 minutos. Después, la fitasa se testó en cuanto a la actividad enzimática y se comparó con la reactividad en el ELISA de fitasa (Figura 2) y la reactividad con las inmunitiras de fitasa (Figura 3).

35 Comparación del ELISA: La Figura 2 muestra una gráfica de la actividad residual de Nov9X después de incubación a 99°C 28-04-03 TAM purificado por FPLC lote nº PHY-PP9XR-PB200L comparación de la actividad frente a los datos de ELISA. Esto demuestra que el ensayo ELISA y las inmunitiras parecen detectar solamente la fitasa activa. En ningún ensayo se detecta fitasa inactivada por calor.

40 EJEMPLO 4: Kit de inmunoensayo de fitasa Quantum™ (Nov9X)

Este test diagnóstico (véase la Figura 4) se diseñó para la detección rápida (10 min) de fitasa Quantum™ (Nov9X) en alimentos. El kit contiene todos los reactivos y el equipo necesario para llevar a cabo el ensayo. El kit se puede almacenar a las temperaturas ambiente que no excedan de 100° F (38°C). Los tests se empaquetan en una bolsa con una lámina sellada a prueba de la humedad con un desecante de gel de sílice capaz de absorber algo de humedad. Mantener el test en su envase hasta antes de su uso. Evitar colocar el test en un lugar húmedo.

Proceso de Ensayo

1. Llenar el tubo grande con alimentos hasta la marca de 15. Añadir esta cantidad de alimentos a una cara del inserto de malla dentro de la bolsa de extracción.
- 50 2. Retirar un recipiente de plástico del tampón de extracción (25 ml) del kit y verterlo en la bolsa de extracción.
3. Cerrar la bolsa y mover suavemente el tampón por encima de los alimentos para asegurar que todos los alimentos estén húmedos. Esperar al menos 10 minutos.
- 55 4. Retirar un test de campo de la bolsa de papel de aluminio y colocarlo en una superficie seca plana. Verificar el desecante. Debería ser de color azul. Si es de color rosa, los ensayos ya no son válidos y

deberían desecharse.

5. Utilizando la pipeta de transferencia, transferir 3-5 gotas del extracto de alimentos para llenar el pocillo de muestra del test de campo.

6. Esperar aproximadamente 5 minutos a que los resultados aparezcan en la ventana por encima del pocillo de la muestra.

Resultados

Si en la muestra está presente fitasa Quantum™ (Nov9X), en la ventana de resultados del test de campo aparece una doble línea roja. La línea inferior indica la presencia de fitasa Quantum™ (Nov9X), mientras que la línea superior es la línea control que señala un dispositivo que funciona adecuadamente. La línea del test no será tan intensa como la línea control. Cualquier reacción observada en esta línea del test se considera positiva.

Si no está presente fitasa Quantum™ (Nov9X), solamente aparece una línea de control roja en la ventana de resultados.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5: Detección de fitasa en alimentos en gránulos

Este ejemplo demuestra el uso de los ensayos de inmunotira para detectar fitasa en alimentos para animales en gránulos.

Los métodos y reactivos se describen como antes en el Ejemplo 4, con la excepción de que los alimentos para animales en gránulos se machacan hasta una consistencia de grano o polvo con cualquier dispositivo mecánico, y de que el tampón de extracción era metanol al 5% con Tween-20 al 0,5% en agua en lugar del tampón borato. También, el anticuerpo anti-fitasa procedía de pollo en lugar de conejo. Los resultados se recogen a continuación en las Tablas 4 y 5. Las Tablas 4 y 5 demuestran que la fitasa Quantum® era detectable tanto en dietas machacadas o de inicio (antes de la granulación) y en dietas granuladas o desmenuzadas utilizando el ensayo ELISA. En la Tabla 5, la actividad se confirmó también con el ensayo de actividad enzimática. Los resultados para las dos Tablas 4 y 5 se confirmaron también por el ensayo de inmunotira (resultados no mostrados)

Tabla 4 Detección de fitasa en alimentos en gránulos o machacados

Dieta	Resultado ELISA ng/ml	Nivel de fitasa añadido	Tipo
Dieta de inicio RA0309 1	0	0	machacada
Dieta de inicio RA0309 9	0	0	en gránulos
Dieta de inicio RA0309 4	0	0	machacada
Dieta de inicio RA0309 15	0	0	en gránulos
Dieta de inicio RA0309 11	22,3375	285	machacada
Dieta de inicio RA0309 19	24,9875	285	machacada
Dieta de inicio RA0309 2	8,8425	285	en gránulos
Dieta de inicio RA0309 23	10,93	285	en gránulos
Dieta de inicio RA0309 6	27,495	566	machacada
Dieta de inicio RA0309 17	46,25	566	machacada
Dieta de inicio RA0309 13	19,76	566	en gránulos
Dieta de inicio RA0309 21	24,425	566	en gránulos
Dieta de inicio RA0309 3	58,19	1133	machacada
Dieta de inicio RA0309 14	69,0275	1133	machacada
Dieta de inicio RA0309 7	20,7225	1133	en gránulos
Dieta de inicio RA0309 22	32,825	1133	en gránulos
Dieta de inicio RA0309 12	153,62	2832	machacada
Dieta de inicio RA0309 24	173,7425	2832	machacada
Dieta de inicio RA0309 10	104,2125	2832	en gránulos
Dieta de inicio RA0309 28	100,6525	2832	en gránulos
Dieta de inicio RA0309 5	0	305	Romozyme

Dieta de inicio RA0309 26	0	605	Romozyme
---------------------------	---	-----	----------

Tabla 5 Actividad de fitasa y cuantificación por ELISA de fitasa en dietas de inicio y desmenuzada

Dieta de inicio	Media de la actividad extraíble (UFT/kg)	Resultado ELISA ng/ml
T1	37,7	0,0
T2	301,1	4,9
T3	426,3	16,7
T4	74,8	0,0
T5	209,8	7,5
T6	449,3	17,3
T7	58,0	0,0
T8	152,7	4,0
T9	806,6	13,3
T10	436,5	18,4
Dieta desmenuzada		
T1	50,6	0,0
T2	142,2	4,5
T3	353,7	11,4
T4	68,7	0,0
T5	167,7	12,7
T6	237,8	9,1
T7	50,4	0,9
T8	234,4	8,8
T9	301,7	13,6
T10	711,0	22,5

5 EJEMPLO 6 Producción de anticuerpos monoclonales contra fitasa

Se generaron anticuerpos monoclonales contra fitasa utilizando un método basado en el inicialmente descrito por Kohler G., Milstein C. Nature 256, 495-497 (1975). Se inmunizó a ratones (raza Alderley Park) con proteína fitasa (Ref. NOV 9X de *Pichia pastoris* 10/13/03). Se suministraron tres dosis de 20 µg mediante inyección subcutánea a intervalos de dos semanas. La dosis uno incluía adyuvante completo de Freund; las dosis dos y tres incluían adyuvante incompleto de Freund. Al menos seis semanas después de la tercera dosis, a los ratones se les proporcionó un refuerzo con dosis de 20 µg de fitasa suministrados por vía intravenosa sin adyuvante. Los bazos se recolectaron cuatro días después de la dosis de refuerzo intravenosa. Los linfocitos se arrastraron por lavado de los bazos con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suministrado mediante jeringas con agujas de calibre 20.

Células de mieloma NS0 (HGPRT-) se obtuvieron de la European Collection of Cell Cultures. Las células de mieloma se cultivaron en DMEM que contenía 584 mg/L de L-glutamina, 13,6 mg/L de hipoxantina, 3,88 mg/L de timidina y suero de bovino fetal (FBS – siglas en inglés) al 10% a 37°C en 5% de CO₂. Se seleccionaron células de mieloma para la fusión cuando se encontraban a una densidad de aproximadamente 5 x 10⁵/ml.

Linfocitos procedentes de un bazo individual (aproximadamente 2 x 10⁸) se mezclaron con 2 x 10⁷ células de mieloma NS0. La mezcla de células se sedimentó mediante centrifugación, y el sobrenadante se decantó. El sedimento de células se resuspendió suavemente y luego se fusionó mediante la adición gota a gota de 1 ml de polietilenglicol al 50% (1500) en tampón HEPES pH 8 a lo largo de un minuto. Después se añadió lentamente, a lo largo de varios minutos, medio de cultivo completo (DMEM que contenía L-glutamina, hipoxantina, timidina y FBS) hasta un volumen final de 50 ml. La fusión resultante se extendió luego en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Varias horas más tarde, los pocillos de fusión se recubrieron con un volumen igual de medio completo que contenía también hipoxantina, timidina y 0,352 mg/L de aminopterinina.

30

Aproximadamente dos semanas después de la fusión, los sobrenadantes del cultivo se sometieron a ensayo en cuanto a la presencia de anticuerpos específicos para fitasa, utilizando un ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de captura de anticuerpos basado en el método descrito por Engvall E. y Perlmann P. *Immunochemistry* 8, 871-874 (1971); y Harlow E. et al., *Antibodies – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988) págs. 182-183.

Además, también se sometieron a ensayo sobrenadantes del cultivo mediante Biacore®, una técnica de análisis de interacción biomolecular que utiliza la tecnología de resonancia de plasmon superficial para seleccionar anticuerpos capaces de capturar fitasa a partir de disolución y también detectar pares de anticuerpos capaces de unirse simultáneamente a fitasa. El método se desarrolló a partir del descrito por Fägerstam L. et al., *J. Mol. Recognition* 3, 208-214 (1991).

Luego se tomaron células de hibridoma seleccionadas a lo largo de al menos dos rondas de clonación, limitando la dilución después de un re-ensayo para asegurar tanto una capacidad de clonación como una estabilidad de los hibridomas. Se prepararon bancos de hibromas congelados.

La producción de anticuerpos monoclonales seleccionados se consiguió ampliando en escala el cultivo de tejidos. Los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes del cultivo mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína G Sepharose utilizando un método estándar según se describe en el Manual de Purificación de Anticuerpos publicado por Amersham Biosciences (parte de GE Healthcare).

EJEMPLO 7 Inmuntiras de anticuerpos monoclonales

La inmuntira de flujo lateral comprendía una membrana de detección de nitrocelulosa (2,5 x 18 cm) soportada sobre un respaldo de plástico, en la que se pulverizó una línea de 1 mm de anticuerpo monoclonal anti-fitasa de una de las líneas de células nº PHY36 (ACC2699), nº PHY37 (ACC2700) o nº PHY46 (ACC2701). Una línea de control de reactivo de anticuerpo anti-ratón de burro se pulverizó en paralelo por encima de la primera línea de anticuerpos. La porción extrema del fondo de la tira de nitrocelulosa se recubre con un trozo de tira de poliéster. La tira de poliéster se trata primeramente con BSA al 0,5%, poli(alcohol vinílico) al 0,5% y Triton X-100 al 0,1%; tampón fosfato 50 mM pH 7,4 y el anticuerpo monoclonal anti-fitasa conjugado con oro coloidal procedente de nº PHY34 (ACC2698) (anticuerpo conjugado a oro coloidal de 40 nm de Capricorn Products, Inc., Portland, ME). La tira de poliéster se dejó secar. Después, la tira de poliéster se recubrió con una almohadilla de algodón de aplicación de muestras. La almohadilla de aplicación de muestras se trató también previamente con Triton X-100 al 0,1% y tampón borato 0,1 M, pH 8,5, y se dejó secar. Flanqueando el otro extremo o extremo superior de la tira de celulosa se encuentra otra almohadilla de algodón para absorber la disolución procedente de la muestra después de haber pasado sobre las zonas del anticuerpo de ensayo y del anticuerpo control en la nitrocelulosa. Esta tarjeta completada se cortó luego en tiras de ensayo de 4 mm para ajustarse a una casete de plástico con una aplicación de la muestra ovalada bien situada por encima de la almohadilla de muestras y una ventana de detección rectangular situada por encima de la zona de detección de la membrana de nitrocelulosa.

La Figura 5 demuestra que las tres líneas de anticuerpos monoclonales, PHY46, PHY36 y PHY37 eran capaces de detectar la enzima fitasa en muestras de alimentación de cereales con contenido en fitasa. El anticuerpo anti-fitasa PHYMAb 28 monoclonal no funcionaba en el ensayo de inmuntiras (datos no mostrados)

EJEMPLO 8 Reactividad del anticuerpo monoclonal a diversas proteínas fitasa

Este ejemplo demuestra la diferencia en la reactividad del anticuerpo anti-fitasa monoclonal a diferentes enzimas fitasa procedentes de fuentes bacterianas o fúngicas. Las inmuntiras se prepararon y realizaron según se describe antes en el Ejemplo 7. El anticuerpo anti-fitasa PHY37 monoclonal se utilizó como el anticuerpo de revestimiento, y PHY34 se utilizó como el anticuerpo marcado (marcado con oro coloidal). Se utilizaron muestras de otras enzimas fitasa comerciales como muestras que incluían: Ronozyme®, Phyzyme® y Natuphos®.

Los resultados en la Figura 6 demuestran que las inmuntiras hechas con anticuerpos anti-fitasa policlonales detectan la fitasa Quantum™ y Phyzyme® que son enzimas fitasa derivadas de *E. coli*, pero no detectan enzimas fitasas derivadas de hongos tales como Ronozyme® y Natuphos®. Las inmuntiras preparadas con anticuerpos anti-fitasa monoclonales solamente detectan fitasa Quantum™.

EJEMPLO 9 ELISA de anticuerpo monoclonal

5 Este ejemplo describe la detección y medición cuantitativa de enzima fitasa en una muestra de maíz utilizando anticuerpos monoclonales en la técnica inmunológica ELISA.

10 Las placas de múltiples pocillos (Nunc, Maxisorp) se revistieron a 4°C durante una noche con el anticuerpo anti-fitasa nº 46 monoclonal (línea de células PHY46 – ACC2701) a una concentración de 1 µg/ml, diluido en borato de sodio/ácido bórico 50 mM, NaCl 75 mM, pH 8,5. Las placas se lavaron cinco veces con Tris 10 mM que contenía Tween-20 al 0,05% y azida de sodio al 0,03%, pH 8,0 (tampón de lavado). Nota: la misma etapa de lavado se llevó a cabo después de cada período de incubación para separar anticuerpos/muestras no ligados. Después, las placas se bloquearon durante 45 min a la temperatura ambiente con albúmina de suero bovino al 1%, Tween-20 al 0,05%, azida de sodio al 0,03%, NaCl 150 mM en fosfato de sodio 100 mM, pH 7,4 (diluyente). Cien microlitros de cada una de las muestras se añadieron a la placa y se incubaron durante 1,5 h a la temperatura ambiente. El anticuerpo anti-fitasa PHY28 monoclonal biotinilado (diluido hasta 1 µg/ml en diluyente) se añadió luego a las placas y se incubó durante 1 h a 37°C. El anticuerpo de detección (estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina se diluyó hasta 2 µg/ml en diluyente) se añadió a las placas y se incubó durante 1 h a 37°C. Se añadió el sustrato, paranitrofenilfosfato (pNPP), y se dejó desarrollar durante 30 min a la temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 405 nm con 492 nm como referencia.

20 La curva patrón de fitasa producía la curva patrón sigmoidal esperada utilizando un ajuste de curva de 4 parámetros (véase la Figura 7). La curva se representó linealmente frente a log con un intervalo de 0 a 64 ng/ml. Para representar la curva patrón de 4 parámetros en un eje log X, el patrón de 0 ng/ml debe introducirse en el programa de análisis a razón de 0,001 ng/ml en lugar de 0 ng/ml. El programa de análisis utilizado era el software WinSelect™ para el lector de microplacas Tecan Sunrise™, a pesar de que funcionará cualquier programa de ajuste de curva de cuatro parámetros.

EJEMPLO 10 Reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal con otras enzimas fitasa

30 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se sometieron a ensayo en cuanto a su reactividad cruzada con la enzima fitasa fúngica, Ronozyme®, y en cuanto a su especificidad por la fitasa Quantum™ (Nov9X) utilizando los ensayos ELISA descritos anteriormente en el Ejemplo 9.

35 Los resultados se recogen en la Tabla 6. Los anticuerpos monoclonales nº 36 y 37 reaccionaban de forma cruzada con la fitasa de *E. coli* (Phyzyme®). El Acm (anticuerpo monoclonal) nº 34 no tenía ninguna reactividad cruzada con Phyzyme, pero sí reaccionaba con la fitasa Quantum™ derivada de la enzima de *E. coli*. Los anticuerpos monoclonales nº 46 y nº 28 también eran específicos para la fitasa Quantum™. Ninguno de los anticuerpos, incluido el anticuerpo policlonal de cabra, reaccionaba de forma cruzada con las enzimas fitasa fúngicas, Ronozyme® o Natuphos®.

40 Para realizar inmunorreacciones utilizando el Acm nº 34 en calidad del anticuerpo marcado con oro, harían al ensayo específico para la fitasa Quantum™. Los Acms nº 46 y 28 también podrían utilizarse para hacer un inmunoensayo específico para la fitasa Quantum™.

45 Tabla 6 Porcentaje de reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales con diversas enzimas fitasa

Fitasa	Acm 34	Acm 36 (referencial)	Acm 37 (referencial)	Acm 46	Acm 28	anti-Nov9X de cabra
Quantum™	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Ronozyme®	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
Phyzyme®	<0,01%	125%	64%	<0,01%	<0,01%	71%
Natuphos®	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%

EJEMPLO 11 ELISA de fitasa Quantum™ rápido

Este ejemplo describe la detección y medición semi-cuantitativa de la enzima fitasa en una muestra de alimentos utilizando anticuerpos monoclonales en la técnica inmunológica ELISA. El método y los resultados típicos se muestran en las Figuras 8A-J.

- 5 Las placas de múltiples pocillos (Nunc, Maxisorp) se revistieron a 4°C durante una noche con el anticuerpo anti-fitasa n° 46 monoclonal (línea de células PHY46 – ACC 2701) a una concentración de 1 µg/ml, diluido en borato de sodio/acetato bórico 50 mM, solución salina tamponada con NaCl 75 mM, pH 8,5. Las placas se lavaron cinco veces con un tampón base Tris pH 8,0 (Tris 10 mM que contenía Tween-20 al 0,05% y azida de sodio al 0,03%, pH 8,0). Después, las placas se bloquearon durante 1 h a la temperatura ambiente con StabilCoat® (SurModics, Inc.)
- 10 y se secaron durante 18-24 h a 30°C y una humedad del 18%. Cien microlitros de cada una de las muestras se añadieron a la placa y se incubaron durante 15 min a la temperatura ambiente. La placa se lavó cinco veces con agua destilada y se emborrónó por transferencia sobre papel absorbente. Anticuerpo anti-fitasa PHY28 monoclonal conjugado con peroxidasa, diluido hasta 1 µg/ml en albúmina de suero bovino al 1%, Tween-20 al 0,05%, Kathon CG® al 0,04% (Supelco, Inc.), NaCl 150 mM en fosfato de sodio 100 mM, pH 7,4 se añadió a las placas y se
- 15 incubó durante 15 min a la temperatura ambiente. Se añadió el sustrato, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y se dejó desarrollar durante 15 min a la temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 650 nm o se comparó visualmente con los controles.

EJEMPLO 12 Kit de extracción de fitasa

- 20 **Uso pretendido**

Este kit de extracción contiene materiales para la extracción de 20 muestras de alimentos. Se requiere agua destilada o desionizada, pero no se proporciona.

- 25 **Requisitos de almacenamiento-** Almacenar el kit a temperatura ambiente

Materiales proporcionados

- 30 1. 20 recipientes de extracción
 2. 2 paquetes de tampón borato
 3. 2 frascos de hidróxido de sodio (NaOH) 10 N
 4. 2 tubos de Tween-20 al 10%
 5. 1 tubo de 50 ml
 6. directrices de uso

Materiales recomendados, pero no proporcionados

- 35 1. Picadora de alimentos (Cuisinart CCM-16PC)
 2. Balanza capaz de pesar 20 gramos
 3. Cilindro aforado de 100 ml.
 40 4. Recipiente de 1 litro

Precauciones

Manipular con cuidado la disolución de hidróxido de sodio. Deberían utilizarse guantes para evitar una exposición potencial a la piel

- 45 **Directrices**

1. Llenar un recipiente adecuado con 1 litro de agua destilada o desionizada.
 2. Añadir el contenido de un paquete que contiene tetraborato de sodio.
 3. Añadir el contenido completo de un frasco que contiene hidróxido de sodio (**utilizar guantes**).
 50 4. Añadir el contenido completo de un tubo de Tween-20.
 5. Mezclar a fondo hasta que se haya disuelto por completo todo el contenido.

Extracción de la muestra

- 55 1. Llenar el molinillo de café de rueda cónica Cuisinart con una muestra representativa de 300 g y moler la muestra completa hasta alcanzar un tamaño de partícula de un café instantáneo muy fino (ajuste finísimo en el molinillo).

2. Medir 20 g de la muestra de alimentos molida y añadirlos al recipiente de extracción. Alternativamente, llenar el tubo de 50 ml hasta la marca de 35 ml, golpear ligeramente el tubo sobre una superficie plana para nivelar los alimentos en el tubo y añadir al recipiente de extracción.
3. Añadir 80 ml de tampón de extracción o llenar el recipiente de extracción hasta la marca de 110 ml. Agitar vigorosamente durante 1 min. **Es muy importante agitar las muestras a fondo durante el minuto completo con el fin de obtener extracciones consistentes.**
4. Dejar reposar la muestra durante 30 minutos antes del ensayo para permitir la sedimentación de las partículas insolubles

EJEMPLO 13 Kit de detección rápida de enzimas para fitasa Quantum™

Introducción

Este kit de diagnóstico está diseñado para la detección de fitasa Quantum™ en alimentos. El test es un método ELISA en el formato de microplacas estándar (8 x 12 pocillos). El test es rápido (45 minutos) así como muy sensible. Proporciona el examen de 44 muestras por duplicado o de 88 muestras en una determinación sencilla. El kit proporciona también la flexibilidad de someter a ensayo tan pocas como 2-4 muestras en 12 tests separados. El kit contiene una muestra control negativa y 3 muestras control positivas.

Principio del ensayo

Los pocillos de la fase sólida se revisten con un anticuerpo que reconoce específicamente fitasa Quantum™

1ª reacción: fitasa Quantum™ presente en la muestra se une al anticuerpo inmovilizado, formando el complejo antígeno-anticuerpo. Un segundo anticuerpo, dirigido contra fitasa Quantum™, se une al complejo antígeno-anticuerpo. Este anticuerpo (el conjugado) se marca con peroxidasa de rábano picante.

2ª reacción: el complejo antígeno-anticuerpo marcado con enzimas convierte un sustrato en un producto azul. Muestras que contienen fitasa Quantum™ exhiben el desarrollo del color azul, mientras que muestras sin fitasa Quantum™ permanecen incoloras.

Requisitos de almacenamiento

El kit es estable hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta cuando se almacena refrigerado a 2-8°C.

Materiales proporcionados

7. 96 micropocillos revestidos con anticuerpos
8. 4 frascos de 0,7 ml cada uno de 0, 200, 400 y 800 unidades/kg de controles de fitasa Quantum™
9. 1 frasco de 6 ml de disolución de conjugado HRP
10. 1 frasco de 6 ml de disolución de sustrato TMB

Materiales recomendados, pero no proporcionados

5. kit de extracción
6. Balanza capaz de pesar 20 gramos
7. Cilindro aforado de 100 ml
8. Picadora de alimentos (Cuisinart CCM-16PC)
9. Piceta para agua destilada/desionizada
10. Pipetas de 1 y 8 canales para 50 y 100 µl
11. Puntas de pipeta
12. Fotómetro de microplacas equipado con un filtro de 650 nm.

Extracción de la muestra

5. Llenar el molinillo de café de rueda cónica Cuisinart con una muestra representativa de 300 g y

moler la muestra completa hasta alcanzar un tamaño de partícula de un café instantáneo muy fino (ajuste finísimo en el molinillo).

6. Medir 20 g de la muestra de alimentos molida y añadirlos a un recipiente de extracción.
7. Añadir 80 ml de tampón de extracción (borato 25 mM pH 10,0, que contiene Tween-20 al 0,01%). Agitar a fondo durante 1 min. **Es muy importante agitar las muestras a fondo durante el minuto completo con el fin de obtener extracciones consistentes.**
8. Dejar reposar la muestra durante 30 minutos antes del ensayo para permitir la sedimentación de las partículas insolubles

10 Proceso de ensayo

Permitir que todos los reactivos se calienten hasta la temperatura ambiente (18-30°C) antes del uso (aproximadamente 30 min).

1. Retirar la placa de microtitulación de la bolsa de papel de aluminio. Retirar las filas de pocillos que no se necesiten para el test y devolverlos a la bolsa de papel de aluminio. Sellar la bolsa para mantener secos los pocillos no utilizados.
2. Utilizar una pipeta, transferir los controles y los extractos preparados a los pocillos de la placa; 50 µl por pocillo. Utilizando una pipeta de 8 canales, dispensar disolución de conjugado HRP a razón de 50 µl por pocillo a todos los pocillos de la placa. Mezclar los contenidos de los pocillos agitando suavemente la placa en un movimiento de vaivén sobre una superficie plana durante 10-20 segundos, sin que los reactivos salpiquen fuera de los pocillos. Incubar durante 30 min a la temperatura ambiente.
3. Vaciar el contenido de los pocillos. Lavar todos los pocillos al llenar los mismos con agua destilada/desionizada y después separar por agitación el contenido. Repetir esto 5 veces y luego golpear ligeramente la placa firmemente sobre varias capas de toallas de papel para eliminar el agua residual.
4. Utilizar una pipeta de 8 canales, dispensar la disolución de sustrato de TMB (frasco ámbar) a todos los pocillos de la placa a razón de 100 µl por pocillo. Incubar durante 15 min a la temperatura ambiente.
5. Leer la densidad óptica a 650 nm o comparar visualmente los pocillos de muestras con los pocillos control.

Análisis de los resultados

El ensayo se hace funcionar adecuadamente si los controles (200, 400 y 800 unidades/kg) exhiben un color azul con una intensidad gradualmente creciente y el control negativo permanece incoloro.

Modificaciones de los presentes reactivos, métodos y kits para detectar fitasa Quantum™ (Nov9X) resultarán obvios a los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada que antecede.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígenos del mismo que reacciona específicamente con fitasa QUANTUM™ (Nov9X) que es producido por la línea de células de hibridoma PHY34 depositada como DSM ACC2698; la línea de células PHY46 depositada como DSM ACC2701 o la línea de células PHYTASE Mab 28 depositada como DSM ACC2715.
- 2.- El anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo de la reivindicación 1, que ha sido marcado.
- 10 3.- El anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo de la reivindicación 2, que ha sido marcado con biotina, peroxidasa, fosfatasa alcalina, glucoamilasa o beta-galactosidasa.
- 15 4.- El anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo de la reivindicación 3, que ha sido marcado con ¹²⁵I, ¹³¹I o tritio
- 5.- Un soporte sólido, al que se ha fijado el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo de la reivindicación 1.
- 20 6.- Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígenos del mismo de la reivindicación 1 y un tampón o diluyente.
- 7.- Una línea de células de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígenos del mismo de la reivindicación 1.
- 25 8.- La línea de células de hibridoma de la reivindicación 7, en donde la línea de células es la línea de células PHY34 depositada como DSM ACC2698; la línea de células PHY46 depositada como DSM ACC2701 o la línea de células PHYTASE Mab 28 depositada como DSM ACC2715.
- 30 9.- Un inmunoensayo para la fitasa QUANTUM™ (Nov9X), que comprende:
- 35 a) poner en contacto el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígenos del mismo de la reivindicación 1 con una muestra de la que se sospecha que contiene la fitasa, durante un tiempo y bajo condiciones adecuadas para unir el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo a la fitasa,
- b) determinar la unión entre el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo y fitasa, y
- c) relacionar la unión a la presencia o cantidad de la fitasa en la muestra.
- 40 10.- El inmunoensayo de la reivindicación 9, que es un RIA o que es un EIA.
- 11.- Un inmunoensayo para la detección de fitasa QUANTUM™ (Nov9X) en una muestra, que comprende las etapas de:
- 45 a) preparar un extracto de la muestra en presencia de un anticuerpo monoclonal primario o fragmento de unión a antígenos de la reivindicación 1 que reconoce inmunológicamente la fitasa en el extracto, de modo que se forma un complejo de anticuerpo primario-fitasa;
- 50 b) preparar un formato en fase sólida que tiene una medición en tres dimensiones para formar un volumen con una pluralidad de espacios intersticiales, al unir al formato en fase sólida un anticuerpo secundario deseado o fragmento capaz de reconocer inmunológicamente la fitasa, y en donde el anticuerpo secundario está conjugado a medios de detección, y en donde el anticuerpo secundario reconoce también inmunológicamente la fitasa;
- 55 c) combinar el extracto de la etapa (a) con el formato preparado de la etapa (b), en donde el extracto se extrae a través de los espacios intersticiales del formato en fase sólida preparado capturando el complejo anticuerpo primario-fitasa;

- d) detectar la fitasa por la presencia de dicho complejo anticuerpo primario-fitasa capturado.
- 5 12.- El inmunoensayo de la reivindicación 11, en el que el formato en fase sólida es acetato de celulosa, celulosa, nitrocelulosa o nilón.
- 13.- El inmunoensayo de la reivindicación 12, en el que el formato en fase sólida está constituido por múltiples capas apiladas y contiguas, en donde cada una de las capas es capaz de capturar una fitasa diferente.
- 10 14.- El inmunoensayo de la reivindicación 13, que comprende, además, una almohadilla de absorción de muestras del formato en fase sólida.
- 15.- El inmunoensayo de la reivindicación 14, que comprende, además, una tira que comprende un anticuerpo anti-fitasa marcado.
- 15 16.- El inmunoensayo de la reivindicación 15, en el que los medios de detección son oro coloidal.
- 17.- Un kit para la detección, mediante el inmunoensayo de la reivindicación 14, que comprende:
- 20 a) medios de extracción de la fitasa a partir de una muestra; y
- b) un formato en fase sólida que comprende un anticuerpo monoclonal primario anti-fitasa o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 y que tiene una medición en tres dimensiones para formar un volumen con una pluralidad de espacios intersticiales, al unir al formato en fase sólida un anticuerpo secundario deseado o un fragmento capaz de reconocer inmunológicamente a la fitasa, y en donde el anticuerpo secundario está conjugado a medios de detección, y en donde el anticuerpo secundario reconoce también inmunológicamente a la fitasa.
- 25 18.- El kit de la reivindicación 17, que comprende, además, un recipiente que contiene un tampón.
- 30 19.- El kit de la reivindicación 18, que comprende, además, medios para dispensar la muestra sobre el formato en fase sólida.
- 20.- Un inmunoensayo para la detección y cuantificación de fitasa QUANTUM™ (Nov9X), que comprende las etapas de:
- 35 a) preparar un extracto de una muestra;
- b) incubar una porción del extracto con un anticuerpo monoclonal anti – fitasa primario o un fragmente de unión a antígenos del mismo de la reivindicación 1 que se une a la fitasa, estando unido el anticuerpo primario a un soporte sólido, y un anticuerpo anti – fitasa secundario o fragmento que se une a la fitasa para crear un complejo anticuerpo – fitasa – anticuerpo,
- 40 c) lavar un complejo anticuerpo–fitasa–anticuerpo para separar el anticuerpo secundario no unido;
- d) añadir un anticuerpo de detección que reacciona inmunológicamente con el anticuerpo secundario, en donde el anticuerpo de detección está marcado; y
- 45 e) medir la cantidad de anticuerpo marcado unido o no unido para determinar la concentración de fitasa.
- 50 21.- El inmunoensayo de la reivindicación 20, en el que el marcador detectable es una enzima.
- 22.- El inmunoensayo de la reivindicación 21, en el que la enzima es fosfatasa alcalina, peroxidasa o β-galactosidasa.
- 55 23.- El inmunoensayo de la reivindicación 22, en el que la enzima produce un producto de reacción insoluble.

24.- Un kit para la detección y cuantificación por parte del inmunoensayo de la reivindicación 20, que comprende:

- a) medios para extraer la fitasa QUANTUM™ de una muestra;
- 5 b) un soporte sólido que comprende un anticuerpo anti-fitasa primario de la reivindicación 1, unido al soporte sólido;
- c) un anticuerpo anti-fitasa secundario; y
- 10 d) un anticuerpo de detección capaz de unirse inmunológicamente al anticuerpo secundario, y en donde el anticuerpo de detección está marcado con un marcador detectable.

25.- El kit de la reivindicación 24, en donde el marcador detectable es una enzima.

- 15 26. El kit de la reivindicación 25, en donde la enzima de detección es fosfatasa alcalina, peroxidasa o β -galactosidasa.

27.- El kit de la reivindicación 26, en donde la enzima produce un producto de reacción soluble o insoluble.

- 20 28.- El kit de la reivindicación 27, que comprende, además un sustrato para la enzima

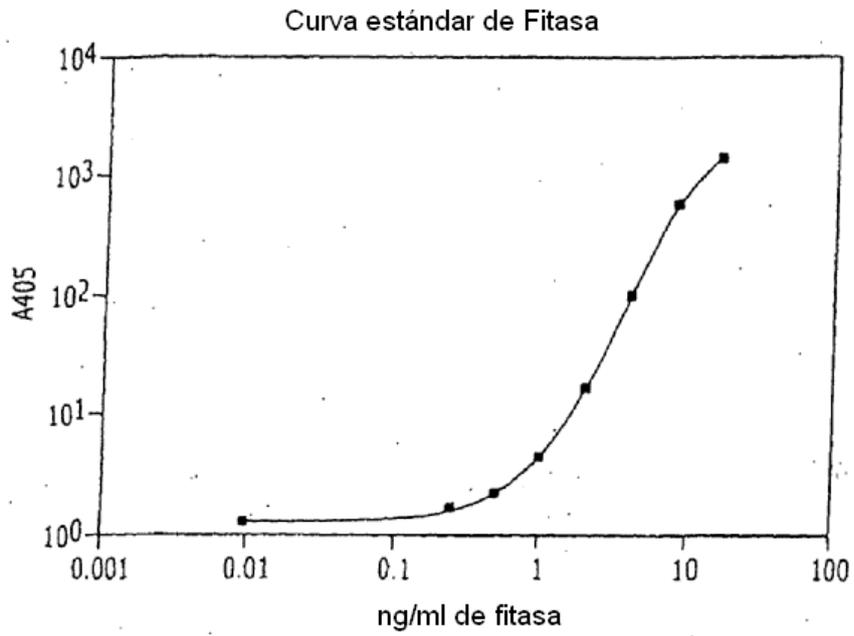


FIGURA 1

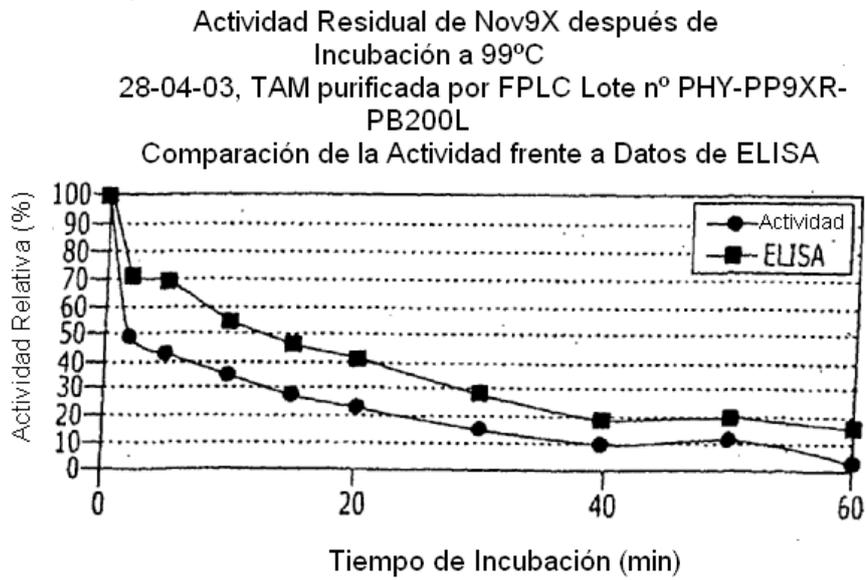


FIGURA 2

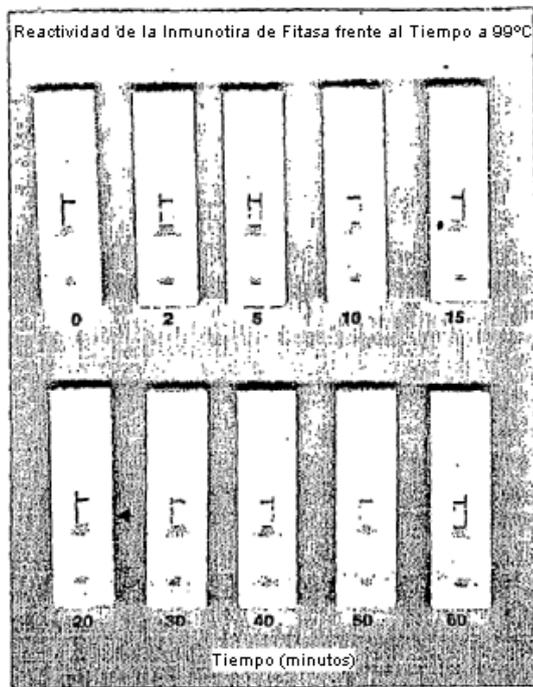


FIGURA 3

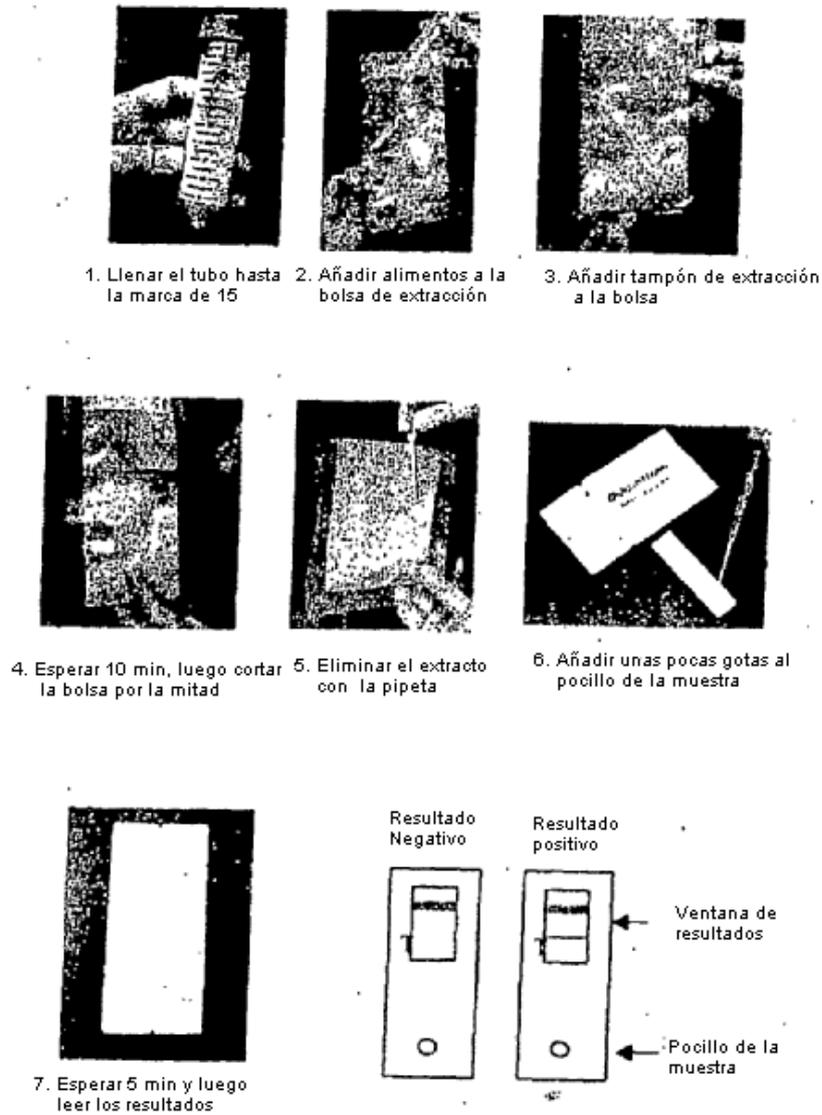


FIGURA 4

Figura 5

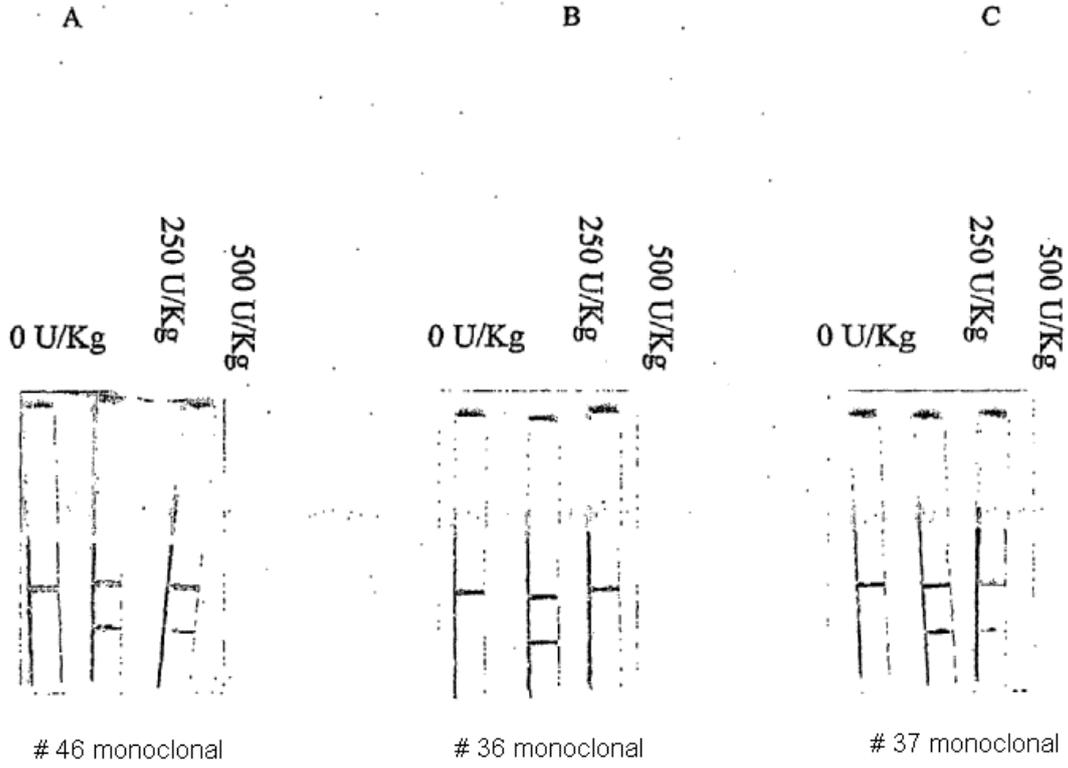
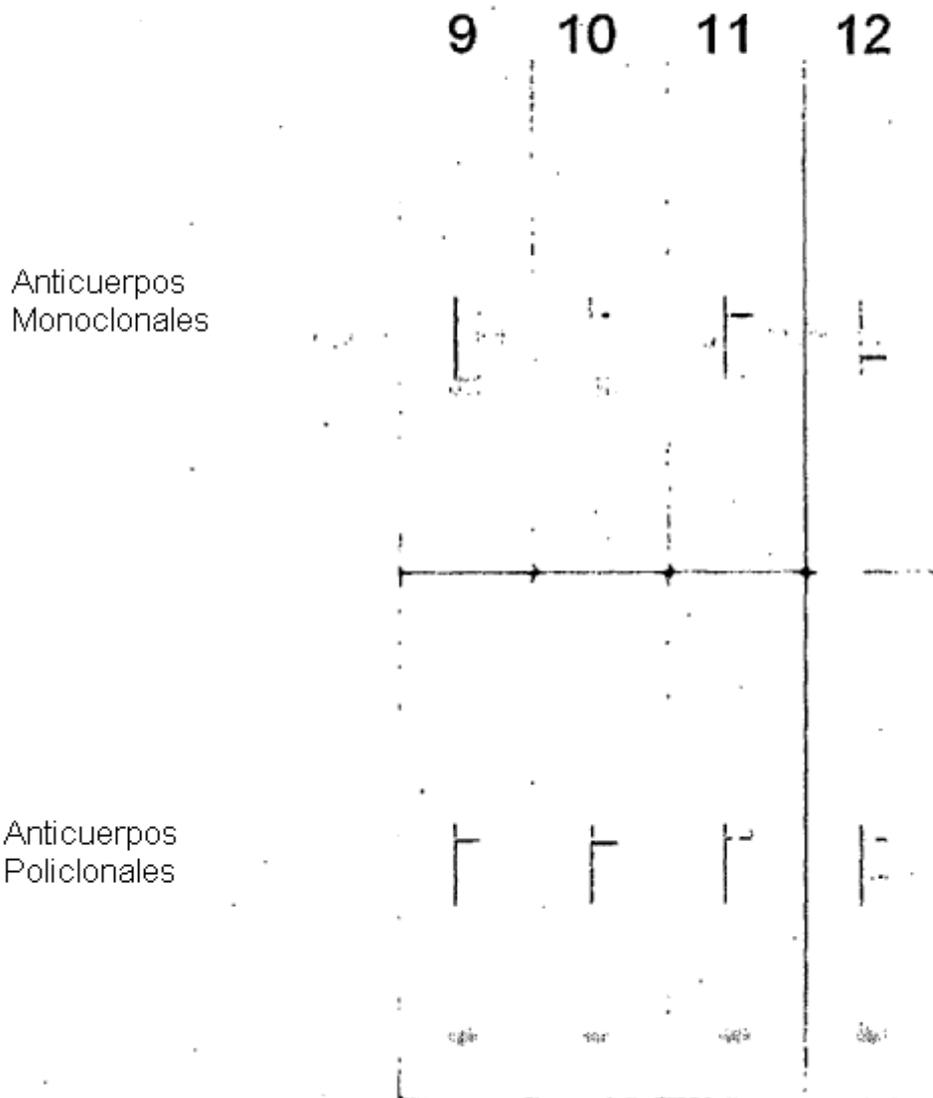


FIGURA 6



Curva estándar de Fitasa

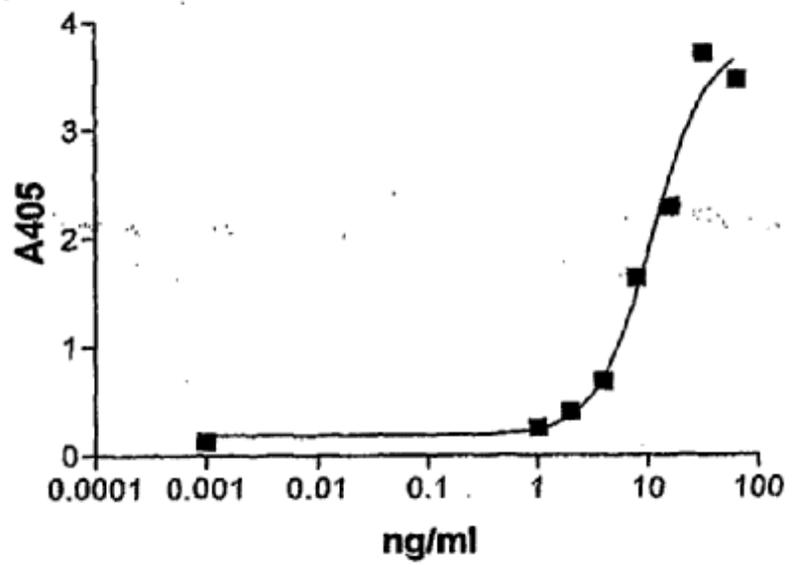
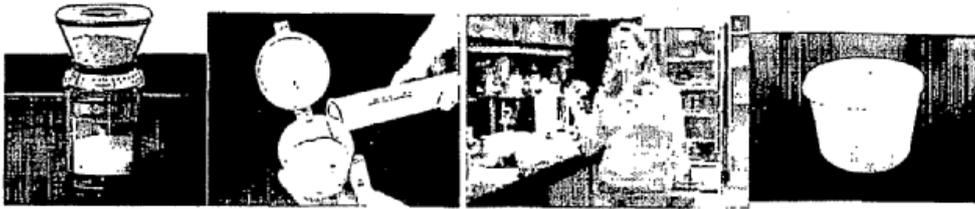


FIGURA 7



8A

8B

8C

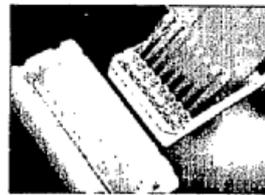
8D



8E



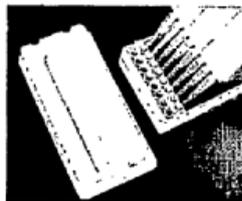
8F



8G



8H



8I



8J



8K

FIGURA 8