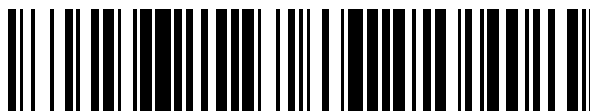


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 335**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 21/82** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 33/545** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05739187 .2**  
96 Fecha de presentación: **10.05.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1752767**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE ENSAYO DEL ÁCIDO HIALURÓNICO UTILIZANDO UNA PROTEÍNA DE UNION AL ÁCIDO HIALURÓNICO.**

30 Prioridad:  
**20.05.2004 JP 2004149940**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2011**

73 Titular/es:  
**WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.**  
**1-2, DOSHOMACHI 3-CHOME, CHUO-KU**  
**OSAKA-SHI, OSAKA 540-8605, JP**

72 Inventor/es:  
**SUMIDA, Kyoichi;**  
**FUJIO, Kazunari y**  
**KOBATAKE, Shinzo**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 335 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

Procedimiento de ensayo del ácido hialurónico utilizando una proteína de unión al ácido hialurónico

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para medir el ácido hialurónico, que tiene buena estabilidad de almacenamiento y que ofrece un alto grado de exactitud en la medición, y a un kit de reactivos para el mismo.

### Antecedentes de la técnica

10 El ácido hialurónico está presente principalmente en el líquido sinovial y en el humor vítreo ocular de los animales y en el tejido conectivo, tal como en el cordón umbilical y la dermis superior de los animales. Se sabe que la concentración de ácido hialurónico en la sangre aumenta en pacientes con artritis reumatoide, cáncer y enfermedades hepáticas y es un marcador útil conocido para el diagnóstico de estas enfermedades, y por consiguiente, se han desarrollado hasta la fecha diversos procedimientos para la medición del ácido hialurónico. Por ejemplo, el documento WO 02/10138A presenta un procedimiento de ensayo homogéneo para la detección del ácido hialurónico que evita el uso de una fase sólida. El procedimiento se basa en una proteína de unión al ácido hialurónico marcada.

15 Por otra parte, para la medición por medios inmunológicos, se han estado utilizando ampliamente procedimientos que usan partículas de látex debido a su sencillo procedimiento y a la posibilidad de aplicación en dispositivos de medición de varios analitos. El documento JP-A-8193999 se refiere a un procedimiento de inmunoensayo dirigido a la detección general de interacciones entre antígeno y anticuerpo. En particular, un complejo inmune I formado por anticuerpo/antígeno, por ejemplo, en una muestra de sangre, es detectado por otro anticuerpo específico, que pueden estar fijado en un vehículo insoluble que actúa como soporte. No se menciona la aplicación del procedimiento al ácido hialurónico. El documento JP-A-11014628 presenta un procedimiento de ensayo diseñado para evitar la dependencia de las interacciones entre antígeno y anticuerpo. En una forma de realización, se inmoviliza una proteína de unión al ácido hialurónico directamente en un vehículo, y de ese modo pueden realizarse ensayos en las muestras biológicas (por ejemplo, sangre) para detectar y cuantificar el ácido hialurónico. El procedimiento que utiliza partículas de látex como reactivo para medir el ácido hialurónico ha sido descrito, por ejemplo, en el documento JP-B-3424504. En la publicación de patente citada anteriormente, se ha descrito un procedimiento que comprende los procesos de fijación de una proteína de unión al ácido hialurónico en partículas de vehículo como soporte, formación de un complejo de reacción entre las partículas y el ácido hialurónico de una muestra y determinación del ácido hialurónico por medio de la detección del complejo de reacción. En los Ejemplos de la publicación de patente citada anteriormente, los experimentos se han llevado a cabo utilizando partículas de látex con un tamaño de partícula promedio de 368 nm de diámetro. Sin embargo, cuando tales partículas se utilizan como reactivo, por lo general, las partículas de látex tienen que dispersarse mediante agitación o similar antes de su uso, puesto que las partículas de látex con un tamaño de partícula promedio de 300 nm (0,3  $\mu\text{m}$ ) de diámetro o mayores tienen tendencia a depositarse con facilidad. Por lo tanto, para la medición del ácido hialurónico utilizando un vehículo tal como las partículas de látex, se ha deseado el desarrollo de un reactivo que no se deposite con facilidad y que no necesite un tratamiento engorroso como la agitación antes de su uso.

Literatura de Patente 1: JP-B-3424504

Literatura de Patente 2: WO 02/101389A

Literatura de Patente 3: JP-A-8 193999

40 Literatura de Patente 4: JP-A-11014628A

### Divulgación de la invención

#### **Problema a resolver por la invención**

45 Teniendo en cuenta la situación anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento que utiliza un vehículo para la medición del ácido hialurónico en el que el depósito del vehículo es inferior, la estabilidad del almacenamiento es buena y tiene una exactitud de medición del mismo alto grado que la medición realizada por medio de los reactivos convencionales, como así también un kit de reactivos para el mismo.

#### **Medios para resolver el problema**

50 Para almacenar un reactivo que contiene partículas de látex para la medición del ácido hialurónico en una manera más estable, los presentes inventores han investigado para encontrar un procedimiento de fijación de una proteína de unión al ácido hialurónico (a continuación en el presente documento, denominada de manera opcional HABP) en partículas de látex con menor depósito (tamaño de partícula promedio: 0,3  $\mu\text{m}$  de diámetro o menor) por medio de enlaces químicos o adsorción física. No obstante, resultó difícil fijar de manera eficaz la HABP en las partículas de látex, y por lo tanto, la medición no pudo llevarse a cabo con un alto grado de exactitud. A continuación, como resultado del estudio intensivo, los inventores encontraron que la reacción de aglutinación de las partículas de látex

según la cantidad de ácido hialurónico podía inducirse con eficacia por medio de la reacción de las partículas de látex, que de manera preliminar se habían sensibilizado con un anticuerpo monoclonal para HABP, con un complejo formado entre HABP y ácido hialurónico. Además, los presentes inventores han encontrado que puede prepararse un reactivo para la medición del ácido hialurónico con buena estabilidad de almacenamiento si se almacenan las partículas de látex, que previamente se han sensibilizado con un anticuerpo monoclonal para HABP y la proteína de unión al ácido hialurónico, de manera individual como reactivos separados. Además, los inventores han encontrado que, como se describió anteriormente, la etapa puede continuar mediante la formación previa de un complejo por medio de la reacción entre el ácido hialurónico y HABP, y a continuación haciendo reaccionar el complejo con las partículas de látex sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal para HABP, y por consiguiente completaron la presente invención.

Es decir, la presente invención se refiere a "un procedimiento para medir el ácido hialurónico que comprende la formación de un complejo de ácido hialurónico/HABP poniendo en contacto el ácido hialurónico de una muestra con HABP, hacer reaccionar dicho complejo con un vehículo que actúa como soporte de los anticuerpos anti-HABP, medir el cambio óptico del producto de la aglutinación generada por dicha reacción y calcular la cantidad de ácido hialurónico a partir del valor medido" y a "un kit de reactivos para la medición del ácido hialurónico que comprende un reactivo que comprende HABP y un reactivo que comprende un vehículo que actúa como soporte de anticuerpos anti-HABP".

### **Efecto de la invención**

De acuerdo con el procedimiento de medición de la presente invención, en comparación con el procedimiento convencional, la medición puede llevarse a cabo mediante un simple procedimiento, sin necesidad de agitar el reactivo antes de su uso, y también, la medición puede llevarse a cabo con el mismo alto grado de exactitud al de la medición con los reactivos convencionales. Además, el kit de reactivos de la presente invención proporciona un menor depósito del vehículo y buena estabilidad de almacenamiento; además, usando dicho kit de reactivos, la medición del ácido hialurónico puede lograrse con el mismo grado de exactitud al de la medición con los reactivos convencionales.

### **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

Como proteína de unión al ácido hialurónico (HABP), en lo que respecta a la presente invención, puede adoptarse sin limitación específica una cualquiera de las proteínas que contienen una región de unión al ácido hialurónico que tiene la propiedad de unirse al ácido hialurónico, tales como proteoglicano, proteína "link" y hialuronectina, y puede incluir la misma proteína descrita anteriormente, una proteína parcial que contenga la región de unión al ácido hialurónico de la proteína descrita anteriormente, una sustancia que contenga tal proteína parcial, y una proteína de recombinación producida por la incorporación de un fragmento del gen que codifica la región de unión al ácido hialurónico de la proteína descrita anteriormente en otra proteína.

Como anticuerpo anti-HABP, en lo que respecta a la presente invención, puede adoptarse cualquier anticuerpo contra HABP, ya sea monoclonal o policlonal. Resulta de preferencia un anticuerpo policlonal o monoclonal, purificado por medio de cromatografía de afinidad con un único epítipo, y resulta particularmente de preferencia un anticuerpo monoclonal capaz de unirse de manera eficaz con el ácido hialurónico. Entre estos, resulta de preferencia el uso de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> producidos por la digestión adecuada de estos anticuerpos utilizando una enzima tal como pepsina y papaína. Cuando se utiliza un anticuerpo policlonal como anticuerpo anti-HABP, el anticuerpo pueden prepararse mediante un procedimiento convencional de inmunización de un animal tal como un caballo, vaca, oveja, conejo, cabra, rata o ratón con la proteína de unión al ácido hialurónico según los procedimientos descritos, por ejemplo, en "Matsushashi, T. y col., Introduction to Experimental Immunology, 2ª ed., 1981, Japan Scientific Societies Press". Cuando se utiliza un anticuerpo monoclonal como anticuerpo anti-HABP, el anticuerpo puede prepararse según un procedimiento convencional, a saber, la tecnología de fusión celular establecida por Kohler y Milstein (G. Kohler y C. Milstein: Nature, 256, 495 (1975)), por ejemplo, utilizando una célula de hibridoma obtenida por fusión de una línea celular derivada de mieloma de ratón con células del bazo de ratón inmunizado previamente con la proteína de unión al ácido hialurónico.

Como vehículo, en lo que respecta a la presente invención, puede adoptarse cualquier vehículo utilizado normalmente en las mediciones por medios inmunológicos, en concreto, se incluyen de preferencia los vehículos preparados a partir de, por ejemplo, sustancias poliméricas orgánicas naturales, tales como glóbulos rojos, bacterias y fragmentos de células, ensamblajes de moléculas, tales como liposomas y micelas poliméricas, compuestos poliméricos sintéticos tales como poliestireno, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poliácridamida, poliglicidilmetacrilato, polipropileno, cloruro de polivinilo, polietileno, policlorocarbonato, resina de silicona y goma de silicona, sustancias inorgánicas tales como vidrio poroso, vidrio molido, alúmina, gel de sílice, carbón activado y óxido de metales. Además, estos vehículos se pueden utilizar en diversas formas tales como tubos, perlas, fragmentos tipo disco, micropartículas o partículas de látex. Entre ellas, las partículas de látex resultan particularmente de preferencia teniendo en cuenta, por ejemplo, que el tratamiento químico de la superficie del vehículo puede llevarse a cabo con facilidad de manera adecuada para cualquier propósito, porque el material del vehículo es un polímero artificial y que prácticamente no tienen lugar reacciones inespecíficas. Con respecto a la calidad del material, no tiene ninguna limitación específica, pero de preferencia incluye, por ejemplo, una partícula de

látex de tipo estireno tales como por ejemplo una partícula de látex de poliestireno y una partícula de látex de tipo ácido acrílico.

Al respecto, entre estas partículas de látex, resultan particularmente de preferencia las partículas de látex de poliestireno y similares que se preparan mediante la reacción de polimerización en emulsión sin utilizar agentes emulsivos. Como tienen una superficie de fuerte naturaleza hidrófoba, las proteínas o péptidos pueden ser adsorbidos sin problemas, y como tienen la superficie cargada negativamente y generan repulsión mutua entre sí, pueden dispersarse de manera estable en una disolución, incluso en ausencia de un agente emulsivo. Además, también pueden utilizarse diversas partículas de látex modificadas (por ejemplo, una partícula de látex modificada con ácido carboxílico mediante la introducción de un grupo carboxilo en el poliestireno descrito anteriormente), una partícula de látex magnética (una partícula magnética encapsulada en una partícula de látex).

Además, con respecto a las partículas de látex a utilizar en la presente invención, el látex disponible en el mercado de pequeño diámetro medio de partícula, a saber, con una gran superficie por unidad de peso, es capaz de soportar un anticuerpo de manera eficaz y también de proporcionar una buena estabilidad de almacenamiento (buena capacidad de dispersión en una disolución), y por lo tanto, se utiliza de preferencia. Más específicamente, el diámetro medio de partícula es por lo general de 0,05 a 0,3  $\mu\text{m}$ , de preferencia de 0,1 a 0,25  $\mu\text{m}$ . Utilizando tales partículas de látex con un diámetro medio pequeño, se puede evitar el depósito de las partículas y se puede lograr un soporte eficaz para un anticuerpo anti-HABP sobre las partículas de látex. Es decir, por medio del uso de tales partículas de látex con anticuerpos anti-HABP soportados, se puede lograr tanto el aumento de la estabilidad de los reactivos de medición como una alta exactitud de medición.

El procedimiento para fijar un anticuerpo anti-HABP incluido en la presente invención sobre un vehículo que actúa como soporte incluido en la presente invención puede llevarse a cabo sin limitaciones específicas, poniendo en contacto el anticuerpo anti-HABP con el vehículo. Pueden incluirse todos los procedimientos muy conocidos de fijación en el soporte per se utilizados generalmente en este campo, y por ejemplo, como un procedimiento de ejemplo, se incluye un procedimiento para fijar el anticuerpo anti-HABP en el vehículo de soporte mediante adsorción física, denominado procedimiento de adsorción física (refiérase a, documento JP-A-1993-41946; SUMILON Technical Report, SUMILON ELISA serie 1, Introduction to ELISA Method, publicado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.; SUMILON Technical Report, SUMILON ELISA serie 2, Solid Phase Surface of ELISA Products, publicado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd., y etc.) como ejemplo representativo. El procedimiento citado anteriormente se utiliza por lo general como procedimiento de preferencia cuando, por ejemplo, se utiliza como vehículos compuestos poliméricos sintéticos tales como poliestireno, polipropileno, cloruro de polivinilo, polietileno, policlorocarbonato; carbón activado; sustancias inorgánicas tales como vidrio poroso, vidrio molido, alúmina, gel de sílice y óxido de metales e hidroxiapatita. Entre ellos, resulta particularmente de preferencia la utilización de vidrio, poliestireno y cloruro de polivinilo en forma de, por ejemplo, tubos, perlas, fragmentos tipo disco, micropartículas o partículas de látex.

Por ejemplo, cuando un anticuerpo anti-HABP incluido en la presente invención se fija en las partículas de látex que actúan como soporte, las partículas de látex se añaden de modo que estén presentes por lo general en una concentración del 0,1 al 10% (p/v), de preferencia del 0,2 al 5% (p/v) y se ponen en suspensión en un disolvente, tal como una disolución tampón que contiene generalmente de 0,05 a 2 mg/ml, de preferencia de 0,1 a 1 mg/ml de un anticuerpo anti-HABP incluido en la presente invención. Después de hacer reaccionar por lo general a una temperatura de 5 a 30  $^{\circ}\text{C}$  y por lo general durante 2 a 3 horas, se llevan a cabo los posteriores tratamientos que se realizan habitualmente en este campo tales como, centrifugación, tratamiento de bloqueo utilizando una disolución que contiene una proteína adecuada tal como albúmina de suero bovino (ASB), finalizando de esta manera el proceso de soporte. Al respecto, también puede lograrse el soporte del anticuerpo anti-HABP en un vehículo por medio de procedimientos de unión químicos utilizados habitualmente en este campo.

El procedimiento para medir el ácido hialurónico de la presente invención puede llevarse a cabo por el procedimiento en el que se forma un complejo de ácido hialurónico/HABP poniendo en contacto el ácido hialurónico de una muestra con HABP, seguido por la reacción del dicho complejo con los anticuerpos anti-HABP fijados en un vehículo que actúa como soporte, seguido por la medición del cambio óptico del producto de aglutinación generado por dicha reacción y seguido por el cálculo de la cantidad de ácido hialurónico a partir del valor medido.

Al respecto, la medición del cambio óptico descrito en el presente documento se refiere a la medición del cambio óptico causado por la formación de inmunoaglutinación, y más concretamente, están incluidos en esta categoría los procedimientos de inmunoaglutinación tales como el procedimiento de aglutinación pasiva inversa, el inmunoensayo nefelométrico y el inmunoensayo turbidimétrico. Estos procedimientos de medición pueden llevarse a cabo según el procedimiento bien conocido per se. Cuando se utiliza el procedimiento de aglutinación pasiva inversa, el procedimiento puede llevarse a cabo según el procedimiento descrito, por ejemplo, en "Successive Course on Biochemical Experiment 5: Investigative Approach to Immunobiochemistry", Tokio Dojin Kagaku Co., Ltd., páginas 36-37, "A Manual of Clinical Laboratory Method", 30ª ed., Kanehara & Co., Ltd., páginas 844-845, y cuando se utiliza el inmunoensayo nefelométrico, el procedimiento puede llevarse a cabo según el procedimiento descrito, por ejemplo, en "A Manual of Clinical Laboratory Test", 30ª ed., Kanehara & Co., Ltd., páginas 851-853, y cuando se utiliza el inmunoensayo turbidimétrico, el procedimiento puede llevarse a cabo según el procedimiento que se describe, por ejemplo, en "A Manual of Clinical Laboratory Method", 30ª ed., Kanehara & Co., Ltd., páginas 853-854.

A continuación se describirá más específicamente el procedimiento de medición de la presente invención tomando como ejemplo el inmunoensayo turbidimétrico que utiliza un vehículo de partículas de látex. Es decir, una muestra que contiene ácido hialurónico (más específicamente, por ejemplo, fluidos corporales, tales como la sangre, el plasma, el suero, el líquido sinovial, el líquido pleural, el líquido linfático, el líquido cefalorraquídeo y la orina) se pone en contacto y se mezcla con un reactivo que contiene la HABP descrita anteriormente para formar el complejo de ácido hialurónico/HABP. A continuación, por ejemplo, se hace reaccionar un reactivo, en el que está soportado (sensibilizado) el anticuerpo anti-HABP anteriormente descrito en partículas de látex con un diámetro de partícula medio, por ejemplo, de 0,05 a 0,3  $\mu\text{m}$ , de preferencia de 0,1 a 0,25  $\mu\text{m}$ , con el complejo descrito anteriormente. El nivel de aglutinación resultante se mide, por ejemplo, por medio de la absorbancia y la concentración se determina a partir de una curva de calibración, preparada previamente utilizando una muestra patrón, y de ese modo, se realiza el ensayo para determinar la cantidad de ácido hialurónico en una muestra. Al respecto, la medición de la absorbancia puede llevarse a cabo por lo general a una longitud de onda de 340 a 1000 nm, de preferencia de 500 a 900 nm. Además, la determinación del nivel de aglutinación no está limitada a la medición de la absorbancia; el nivel puede medirse por cualquier procedimiento bien conocido per se, por ejemplo, por nefelometría o inmunoensayo de conteo. Además, cuando el complejo de ácido hialurónico/HABP se hace reaccionar con un reactivo que contiene un anticuerpo anti-HABP que ha sido fijado en un vehículo de soporte tal como partículas de látex (a continuación en el presente documento, puede referirse al mismo como vehículo que soporta anticuerpos anti-HABP), se puede añadir un agente acelerador de la aglutinación adecuado. Al respecto, ejemplos concretos de tales agentes de aceleración de la aglutinación se describirán en la sección "kit de reactivos" en la presente invención.

En el procedimiento de medición de la presente invención, la concentración de uso de HABP en las reacciones de HABP es, aunque puede variar dependiendo del límite de detección establecido para el ácido hialurónico, por lo general, igual o mayor que la concentración que es capaz de unirse con la cantidad total de ácido hialurónico que corresponde a la concentración establecida del límite de detección, de preferencia 5 veces o más, de más preferencia 10 veces o más que la concentración establecida como límite de determinación. Al respecto, la concentración límite superior de ácido hialurónico en este caso no tiene ninguna limitación, considerando el coste económico del ácido hialurónico, la concentración suele ser de 50.000 veces o inferior, de preferencia de 10.000 veces o inferior. En concreto, la concentración es por lo general de 0,1 a 1000  $\mu\text{g/ml}$ , de preferencia de 0,5 a 1000  $\mu\text{g/ml}$  y de más preferencia de 0,5 a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Por ejemplo, cuando se mide la concentración de ácido hialurónico en suero, habitualmente el límite de determinación va de 10 a 1000 ng/ml. La concentración de uso de HABP en la reacción de HABP puede establecerse, por consiguiente, de manera adecuada dentro del intervalo descrito anteriormente en base al límite de determinación.

Además, con respecto al pH en la reacción anteriormente mencionada, el intervalo del mismo no está limitado específicamente, a condición de que no inhiba la formación del complejo, y es generalmente de 5 a 10, de preferencia de 6 a 8. Además, con respecto a la temperatura de la reacción anteriormente mencionada, el intervalo de la misma no está limitado específicamente, a condición de que no inhiba la formación del complejo, y es generalmente de 5 a 40  $^{\circ}\text{C}$ . Además, como el tiempo de reacción puede variar según las condiciones de reacción, tales como la HABP utilizada y el pH y la temperatura, la reacción puede llevarse a cabo durante varios segundos hasta varias horas según corresponda en función de cada condición.

En el procedimiento de medición de la presente invención, la concentración de uso del vehículo que soporta los anticuerpos anti-HABP en la reacción entre el vehículo que soporta el anticuerpo anti-HABP y el complejo de ácido hialurónico/HABP es, aunque puede variar dependiendo de la concentración de uso de HABP en la reacción anterior, por lo general de 0,2 a 25 mg/ml, de preferencia de 0,5 a 12 mg/ml cuando se utilizan partículas de látex que tienen de 0,01 a 0,1 mg/mg como cantidad de soporte de los anticuerpos anti-HABP, y si está dentro del intervalo de concentración mencionado anteriormente, el ácido hialurónico de una muestra puede medirse con un alto grado de exactitud. Al respecto, pueden adoptarse la condición y el tiempo para la reacción del vehículo que soporta los anticuerpos anti-HABP con el complejo de ácido hialurónico/HABP de acuerdo con los utilizados en la reacción de HABP mencionada anteriormente.

Como kit de reactivos para la medición de ácido hialurónico de la presente invención, puede incluirse un kit que comprende un reactivo que comprende HABP y un reactivo que comprende el vehículo que soporta los anticuerpos anti-HABP. Al respecto, el kit mencionado anteriormente puede contener una sustancia patrón utilizada habitualmente en este campo tal como, por ejemplo, hialuronato de potasio (procedente de cresta de gallo, producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y hialuronato de sodio (procedente de especies de *Streptococcus*, producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

El reactivo que comprende HABP en el kit de reactivos para la medición de ácido hialurónico de la presente invención puede ser uno cualquiera de los reactivos que comprenden HABP según se describió anteriormente, que pueda disolverse en una disolución de tampón adecuada. Como agentes tamponadores utilizados para este propósito, puede adoptarse cualquier tipo de agente tamponador utilizado de manera habitual en la medición por medios inmunológicos, por ejemplo, el agente tamponador Tris, un agente tamponador de fosfato, un agente tamponador de veronal, un agente tamponador de ácido bórico y el agente tamponador Good, y la concentración de tal agente tamponador es por lo general de 5 a 300 mM, de preferencia de 10 a 150 mM, y el pH es habitualmente de 5 a 10, de preferencia de 6 a 8, y la concentración y el pH se seleccionan cada uno de manera adecuada de los intervalos correspondientes descritos anteriormente.

Con respecto a la concentración de HABP en el reactivo anterior que comprende HABP, aunque puede variar dependiendo del tipo de HABP utilizada, se puede establecer que la concentración en la reacción sea la misma concentración que la descrita anteriormente, y se puede seleccionar de manera adecuada para que esté dentro del intervalo de 0,1 a 500 µg/ml, de preferencia de 0,5 a 100 µg/ml.

- 5 En un kit de reactivos para la medición de ácido hialurónico de la presente invención, un reactivo que comprende un vehículo que soporta anticuerpos anti-HABP puede ser cualquier reactivo que contenga el vehículo que soporta anticuerpos anti-HABP descrito anteriormente, que puede ser una suspensión del vehículo que soporta anticuerpos anti-HABP en una disolución de tampón adecuada o un producto liofilizado de los mismos. Como agentes tamponadores utilizados para este propósito, se utiliza cualquier tipo de agente tamponador, a condición de que no inhiba la unión entre el anticuerpo anti-HABP incluido en la presente invención y la HABP, e incluye los mismos agentes tamponadores que los utilizados para el reactivo que comprende HABP descrito anteriormente, y también, el pH y la concentración pueden establecerse del mismo modo, según los valores descrito anteriormente.

15 Además, el reactivo que comprende un vehículo que soporta los anticuerpos anti-HABP se proporciona en muchos casos en forma de una suspensión suspendida en una disolución tal como una disolución de tampón. Como disolución tamponadora utilizada para la preparación de tal suspensión, se adopta cualquiera de las que se utilizan habitualmente en este campo sin limitación específica, y por lo general se utiliza una que tenga una acción tamponadora a pH 5,0 a 10,0, de preferencia en torno al pH neutro, de pH 6,5 a 8,5, por ejemplo resultan de preferencia el tampón de fosfato, el tampón Tris o el tampón Good. Al respecto, dependiendo de las características de las micropartículas insolubles, algunas tienen tendencia a agregarse de forma natural cuando se dejan en condición de suspensión. En tal caso, desde el punto de vista de la estabilidad de almacenamiento, resulta mucho más de preferencia el uso de una disolución tampón ligeramente alcalina, tal como tampón de glicina o tampón de ácido bórico para la preparación de la suspensión. Además, la concentración del agente tamponador en estos tampones se selecciona adecuadamente de manera habitual del intervalo de 10 a 500 mM, de preferencia de 10 a 300 mM. Al respecto, en el reactivo mencionado anteriormente, se pueden añadir, por ejemplo, un agente estabilizador tal como un azúcar, una proteína y un agente tensoactivo, una sal tal como de NaCl y una sustancia conservante en el intervalo utilizado habitualmente en este campo.

30 Cuando el vehículo que soporta los anticuerpos anti-HABP incluido en la presente invención está suspendido en una disolución de tampón descrita anteriormente, la concentración del vehículo que soporta los anticuerpos anti-HABP en la reacción puede establecerse, aunque puede variar dependiendo del tipo de anticuerpo anti-HABP utilizado, que sea la misma concentración que la descrita anteriormente, y puede seleccionarse de manera adecuada para que esté por lo general dentro de un intervalo desde 0,1 hasta 500 µg/ml, de preferencia desde 0,5 a 100 µg/ml.

35 Además, en el reactivo que comprende un vehículo que soporta los anticuerpos anti-HABP incluido en la presente invención, puede coexistir un acelerador de reacciones inmunológicas (acelerador de la reacción de aglutinación) (por ejemplo, polietilenglicol y alcohol polivinílico) en el intervalo de concentración utilizado habitualmente en este campo, e incluso con la coexistencia de tal acelerador de la reacción de aglutinación, por medio el procedimiento de la presente invención, puede impedirse o reducirse la aparición de turbidez inespecífica del componente de proteína desnaturada en el reactivo de medición, que está causada por algún factor. Además, el reactivo descrito anteriormente puede contener un monómero o un polímero de los utilizados como aceleradores de la aglutinación según se describe en el documento JP-A-2002-365296, como un acelerador de la aglutinación, y el intervalo de concentración de los mismos se puede seleccionar según el valor descrito en el documento JP-A-2002-365296. Al respecto, el monómero o el polímero mencionados anteriormente se pueden preparar según el procedimiento descrito en la solicitud de patente anterior.

45 El kit de reactivos para la medición de ácido hialurónico incluido en la presente invención se utilizará para llevar a cabo tal procedimiento de medición, como se describió anteriormente en la presente invención, y las formas de realización de preferencia de los elementos que lo constituyen y los ejemplos específicos son como se describieron anteriormente.

50 Con respecto a una muestra incluida en la presente invención, puede adoptarse cualquier muestra que contenga ácido hialurónico y, en particular, incluye, por ejemplo, fluidos corporales tales como la sangre, el plasma, el suero, el líquido sinovial, el líquido pleural, el líquido linfático, el líquido cefalorraquídeo y la orina, y como muestras de preferencia entre ellas, el suero y la orina.

A continuación se describen más específicamente algunos ejemplos que ilustran la presente invención.

### Ejemplo 1

(1) Preparación de la disolución de prueba

1. Preparación de la primera disolución de prueba (disolución de prueba de HABP)

- 55 Se disolvieron cien (100) µg de proteína de unión al ácido hialurónico (purificada de cartílago de tabique nasal de bovino según un procedimiento de Lauren y col. modificado, producto de Seikagaku Corporation) en 10 ml de una

disolución de tampón HEPES 100 mM (que contenía ASB al 0,1% y NaCl al 1%, pH 7,0). Se definió a esta disolución como primera disolución de prueba.

2. Preparación de la segunda disolución de prueba (partículas de látex sensibilizadas con anticuerpo monoclonal anti-HABP)

- 5 A un tubo de centrifuga de policarbonato de 2 ml de volumen, se le añadieron 800 µl de agua purificada, 100 µl de disolución de partículas de látex (N200, producto de Sekisui Chemical Co., Ltd.: al 10% en peso, partículas de látex con un diámetro de 220 nm), 100 µl de tampón de ácido bórico 500 mM (pH 7,3), 100 µl de disolución de tampón ASES 50 mM que contenía el anticuerpo monoclonal anti-HABP (4,24 mg/ml, pH 6,5) y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 100 minutos para obtener una suspensión de partículas de látex que soportan los anticuerpos monoclonales anti-HABP. Al respecto, el anticuerpo monoclonal anti-HABP descrito anteriormente se preparó según el procedimiento convencional.

- 15 En la siguiente etapa, la suspensión de las partículas de látex que soportan el anticuerpo monoclonal anti-HABP se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. Después de retirar la disolución del sobrenadante, se añadió 1 ml de tampón de ácido bórico 50 mM (que contenía ASB al 2,5%, pH 7,3) al sedimento en la parte inferior del tubo de centrifuga. A continuación, se resuspendió el sedimento mediante ultrasonido durante 1 minuto enfriando con hielo, y posteriormente se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. Después que se retiró la disolución del sobrenadante, se añadió 1 ml de tampón de ácido bórico 50 mM (que contenía ASB al 2,5%, pH 7,3) al sedimento en la parte inferior del tubo de centrifuga. A continuación, se resuspendió el sedimento mediante ultrasonido durante 1 minuto enfriando con hielo. Posteriormente, se incubó la suspensión con agitación a temperatura ambiente durante 120 minutos y se recubrió el área de la superficie de las partículas de látex, donde no se habían fijado anticuerpos, con ASB.

- 20 En la siguiente etapa, la suspensión se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. Después de retirar la disolución del sobrenadante, se añadió 1 ml de tampón de ácido bórico 50 mM (que contenía ASB al 0,5%, pH 7,3) al sedimento en la parte inferior del tubo de centrifuga. A continuación, se resuspendió el sedimento mediante ultrasonido durante 1 minuto enfriando con hielo y se diluyó 3,33 veces con tampón de ácido bórico 50 mM (que contenía ASB al 0,5%, pH 7,3). Se definió a esta disolución como segunda disolución de prueba.

(2) Medición del patrón de ácido hialurónico 1. Preparación de una disolución patrón de ácido hialurónico

- 30 Se diluyó hialuronato de potasio (producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) con tampón de fosfato 50 mM (pH 7,0) para generar disoluciones en concentraciones de 10, 100 y 1000 ng/ml, y se utilizaron como disoluciones patrón de ácido hialurónico.

2. Medición del ácido hialurónico

Se midió la cantidad de ácido hialurónico en las disoluciones patrón de ácido hialurónico preparadas en la sección 1 anterior con las condiciones según se muestran a continuación, utilizando un sistema de equipamiento de medición totalmente automatizado (JEOL Ltd.: Modelo BM-8).

- 35 Muestra: 10 µl

Primera disolución de prueba: 90 µl

Segunda disolución de prueba: 30 µl

Procedimiento de medición: procedimiento "2 point-end"

Longitud de onda dominante: 571 nm

- 40 Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Al respecto, el valor indicado en la tabla es el valor aumentado 10.000 veces del obtenido tras restar el valor del blanco (valor que se obtiene cuando la concentración de ácido hialurónico es cero) del valor medido.

### Ejemplo comparativo 1

(1) Preparación de partículas de látex sensibilizadas con HABP por medio de enlace químico, # 1

- 45 A un tubo de centrifuga de policarbonato de 2 ml de volumen, se le añadieron 900 µl de disolución de tampón TAPS 50 mM (pH 8,0), 100 µl de disolución de partículas de látex de ácido carbónico (al 10% en peso; partículas de látex de ácido carbónico: 200 nm de diámetro; contenido de ácido carbónico: 0,3 meq/g) y 50 µl de una disolución acuosa de carbodiimida hidrosoluble 10 mg/ml (WSC, producto de Dojindo Laboratories), a continuación se dejó en reposo durante 10 minutos para activar los grupos carboxilo en la superficie de las partículas de látex. A continuación, se añadieron 276 µl de una disolución de HABP 1,45 mg/ml en tampón ASES (50 mM, pH 6,5) y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 120 minutos. Además, se añadieron 250 µl de tampón de ácido bórico (50 mM, pH 7,3) que contenía ASB al 2,5% a la disolución de reacción y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante

60 minutos, seguido por la incubación a 5 °C durante la noche. A continuación, se centrifugó la disolución de reacción a 18.000 rpm durante 20 minutos. Después de retirar la disolución del sobrenadante, se añadió 1 ml de tampón de ácido bórico 50 mM (que contenía ASB al 0,5%, pH 7,3) al sedimento en la parte inferior del tubo de centrifuga. A continuación, se resuspendió el sedimento mediante ultrasonido durante 1 minuto enfriando con hielo, y el mismo procedimiento se repitió dos veces. Se definió a la disolución obtenida como una segunda disolución de prueba (1).

(2) Preparación de partículas de látex sensibilizadas con HABP por medio de enlace químico, # 2

Se prepararon las partículas de látex sensibilizadas con HABP por el mismo procedimiento según se describió en el Ejemplo comparativo 1 (1), excepto en que se utilizó la disolución de partículas de látex de ácido carbónico con 10% en peso, con un diámetro de 210 nm y un contenido de ácido carbónico de 0,5 meq/g. Se definió a la disolución obtenida como una segunda disolución de prueba (2).

(3) Preparación de partículas de látex sensibilizadas con HABP por adsorción física

A un tubo de centrifuga de policarbonato de 2 ml de volumen, se le añadieron 524 µl de agua purificada, 100 µl de disolución de partículas de látex (N200, producto de Sekisui Chemical Co., Ltd.: al 10% en peso, partículas de látex con diámetro de 220 nm), 100 µl de tampón de ácido bórico 500 mM (pH 7,3), 276 µl de disolución acuosa de HABP 1,45 mg/ml, y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 120 minutos. En la siguiente etapa, se centrifugó la disolución de reacción a 15000 rpm durante 15 minutos. Después de retirar la disolución del sobrenadante, se añadió 1 ml de tampón de ácido bórico 50 mM (que contenía ASB al 2,5%, pH 7,3) al sedimento en la parte inferior del tubo de centrifuga. A continuación, se resuspendió el sedimento mediante ultrasonido durante 1 minuto enfriando con hielo. Posteriormente se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. Después de retirar la disolución del sobrenadante, se añadió 1 ml de tampón de ácido bórico 50 mM (que contenía ASB al 2,5%, pH 7,3) al sedimento en la parte inferior del tubo de centrifuga. A continuación, se resuspendió el sedimento mediante ultrasonido durante 1 minuto enfriando con hielo. Posteriormente se incubó la suspensión con agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos, seguido por la incubación a 5 °C durante la noche. En la siguiente etapa, la suspensión se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. Después de retirar la disolución del sobrenadante, se añadió 1 ml de tampón de ácido bórico 50 mM (que contenía ASB al 0,5%, pH 7,3) al sedimento en la parte inferior del tubo de centrifuga. A continuación, se resuspendió el sedimento mediante ultrasonido durante 1 minuto enfriando con hielo. Se definió a la disolución obtenida como segunda disolución de prueba (3).

(4) Preparación de partículas de látex sensibilizadas con HABP a través del anticuerpo monoclonal anti-HABP, # 1

A un tubo de centrifuga de policarbonato de 2 ml de volumen, se le añadió 1 ml de disolución de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales anti-HABP preparada en el Ejemplo 1 y 33,5 µl de disolución acuosa de HABP 896 µg/ml, y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 120 minutos, y además se incubó a 5 °C durante 2 días. A continuación, la disolución de reacción resultante se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. Después de retirar la disolución del sobrenadante, se añadió 1 ml de tampón de ácido bórico 50 mM (que contenía ASB al 0,5%, pH 7,3) al sedimento en la parte inferior del tubo de centrifuga. A continuación, se resuspendió el sedimento mediante ultrasonido durante 1 minuto enfriando con hielo. Se definió a la disolución obtenida como segunda disolución de prueba (4).

(5) Comparación de la curva de calibración de reactivos para la medición de ácido hialurónico usando cada disolución de partículas de látex

La cantidad de ácido hialurónico en las disoluciones patrón de ácido hialurónico se midió por el mismo procedimiento que en (2) del Ejemplo 1, excepto en que se usó la disolución de tampón HEPES 100 mM (que contiene ASB al 0,1% y NaCl al 1%, pH 7,0) como primera disolución de prueba y las segundas disoluciones de prueba (1) a (4) se diluyeron 3,33 veces con tampón de ácido bórico 50 mM (que contenía ASB al 0,5%, pH 7,3) como segunda disolución de prueba.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1 junto con el resultado del Ejemplo 1. Al respecto, el valor indicado en la tabla corresponde al valor que se obtuvo tras restar el valor del blanco (valor que se obtiene cuando la concentración de ácido hialurónico es cero) del valor medido y que se multiplicó por un factor de 10.000.

Tabla 1

Concentración de ácido hialurónico (ng/ml)	Segunda DP del Ejemplo	Segunda DP (1)	Segunda DP (2)	Segunda DP (3)	Segunda DP (4)
0	0	0	0	0	0
10	37	35	3	-5	39
100	195	12	-2	-5	165
1000	1586	3	2	-5	1579
DP: disolución de prueba					



Como se desprende claramente de los resultados mostrados en la Tabla 1, cuando se utilizaron las partículas de látex sensibilizadas con HABP preparadas por medio de enlace químico (segunda disolución de prueba (1) y (2) en la Tabla 1) y por adsorción física (segunda disolución de prueba (3) en la Tabla 1), no se observó aglutinación de las partículas de látex correspondiente a la concentración de ácido hialurónico, y por lo tanto no se pudo llevar a cabo una medición exacta. Además, no se observaron diferencias significativas en la medición, entre el caso en el que se usó una disolución de prueba que contenía la partícula, en la que la HABP se fijó de manera preliminar a la partícula de látex que soporta al anticuerpo monoclonal anti-HABP, como segunda disolución de prueba (segunda disolución de prueba (4) en la Tabla 1) y el caso en el que se utilizó una disolución que contenía la HABP como primera disolución de prueba y se usó una disolución que contenía partículas de látex que soportan anticuerpos monoclonales anti-HABP como segunda disolución de prueba (segunda disolución de prueba del Ejemplo en la Tabla 1), y por consiguiente, se confirmó que mediante el uso de estos procedimientos puede realizarse una medición del ácido hialurónico con elevada exactitud.

**Ejemplo experimental 1**

Comparación de la estabilidad temporal de las disoluciones de prueba

La primera disolución de prueba y la segunda disolución de prueba se almacenaron a 30 °C durante 1 mes, y a continuación se midió la cantidad de ácido hialurónico por el mismo procedimiento según se describe en el Ejemplo 1 (2) usando estas disoluciones de prueba almacenadas. Además, tanto la primera disolución de prueba como la segunda disolución de prueba (4) utilizadas en el Ejemplo comparativo 1 se almacenaron a 30 °C durante 1 mes, y a continuación se midió la cantidad de ácido hialurónico mediante el mismo procedimiento según se describe en el Ejemplo comparativo 1 (5) utilizando estas disoluciones de prueba almacenadas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Al respecto, el valor de la absorbancia indicado en la tabla corresponde al valor que se obtuvo al restar el valor del blanco (valor obtenido cuando la concentración del ácido hialurónico es cero) del valor medido, y que se multiplicó por un factor de 10.000. Además, la retención de absorbancia se expresó como el porcentaje del valor obtenido al dividir la absorbancia medida después de una incubación durante 1 mes por la absorbancia medida antes de la incubación.

Tabla 2

Concentración de ácido hialurónico, (ng/ml)	Ejemplo		Segunda disolución de prueba (4)	
	Absorbancia	Retención de absorbancia tras 1 mes (%)	Absorbancia	Retención de absorbancia tras 1 mes (%)
0	0	0	0	0
100	116	80	0	0
1000	1293	95	164	10
5000	3529	90	449	10
10000	2850	85	529	12
Promedio	-	87	-	8

Como se desprende claramente de los resultados que se muestran en la Tabla 2, cuando se utilizó la segunda disolución de prueba (4), a saber, una disolución de prueba que contenía la partícula, en el que la HABP se fijó de manera preliminar a las partículas de látex que soportan los anticuerpos monoclonales anti-HABP, como segunda disolución de prueba, la absorbancia después de transcurrido un mes disminuyó, de manera evidente, en comparación con la absorbancia previa al almacenamiento. Por otro lado, cuando se utilizaron las disoluciones de prueba del Ejemplo 1, a saber, se utilizó una disolución que contenía HABP como primera disolución de prueba y una disolución que contenía partículas de látex que soportan los anticuerpos monoclonales anti-HABP como segunda disolución de prueba, la retención de absorbancia fue del 80% o superior, y se encontró que la estabilidad del reactivo fue significativamente alta en comparación con la observada para la segunda disolución de prueba (4). Por consiguiente, se confirmó que, mediante el uso de un kit de reactivos de la presente invención, puede realizarse una medición del ácido hialurónico con exactitud muy alta, incluso si los reactivos son almacenados durante mucho tiempo.

40

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para medir el ácido hialurónico que comprende:
  - formar un complejo de ácido hialurónico/proteína de unión al ácido hialurónico poniendo en contacto ácido hialurónico de una muestra con la proteína de unión al ácido hialurónico,
- 5 hacer reaccionar dicho complejo con una partícula de látex que soporta los anticuerpos anti-proteína de unión al ácido hialurónico, cuyo diámetro es de 0,05 a 0,3  $\mu\text{m}$ ,
  - medir el cambio óptico producido por la aglutinación del producto generado por dicha reacción y
  - calcular la cantidad de ácido hialurónico a partir del valor medido.
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proteína de unión al ácido hialurónico es una seleccionada de proteoglicano, proteína "link" y hialuronectina.
3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el cambio óptico es el cambio de turbidez o el cambio de absorbancia o el cambio de la intensidad de luz dispersada.
- 15 4. Un kit de reactivos para la medición de ácido hialurónico según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende un reactivo que comprende una proteína de unión al ácido hialurónico y un reactivo que comprende una partícula de látex que soporta los anticuerpos anti proteína de unión al ácido hialurónico cuyo diámetro es de 0,05 a 0,3  $\mu\text{m}$ .