

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 776**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/00** (2006.01)  
**C12Q 1/28** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08760386 .6**  
96 Fecha de presentación: **02.06.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2167676**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2010**

54 Título: **KIT PARA MEDIR EN FORMA SECUENCIAL (1) LA FRACCIÓN ENZIMÁTICAMENTE ACTIVA Y (2) LA CANTIDAD TOTAL DE UNA ENZIMA.**

30 Prioridad:  
**20.07.2007 EP 07112893**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.03.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSITÉ DE LIÈGE  
PLACE DU XX AOÛT, 9  
4000 LIÈGE, BE**

72 Inventor/es:  
**SERTEYN, Didier;  
DUPONT, Ginette;  
FRANCK, Thierry y  
KOHNNEN, Stéphane**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 776 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

Kit para medir en forma secuencial (1) la fracción enzimáticamente activa y (2) la cantidad total de una enzima

### Campo de la invención

5 La presente invención refiere a un kit combinado para medir en forma secuencial la fracción enzimáticamente activa y la cantidad total de una enzima [(tal como mieloperoxidasa (MPO)] en una muestra, y que ha dado como resultado aplicaciones mejoradas en el campo de la veterinaria y la salud humana.

### Antecedentes de la invención

La solicitud de patente internacional WO2005/075986 describe un procedimiento y kit para medir la activación de los neutrófilos.

10 Este procedimiento se basa en un de detección ELISA o SIEFED y un kit para medir el estado de activación de los neutrófilos en una muestra biológica obtenida de un mamífero, preferiblemente un caballo.

15 Este procedimiento se podría utilizar para la detección y/o predicción de enfermedades o patologías, para realizar un seguimiento de la activación de los neutrófilos durante la terapia en un mamífero enfermo, para evaluar la capacidad de los neutrófilos en la lucha contra los microorganismos y/o para destruirlos, para evaluar la eficiencia de los inmunomoduladores (o la capacidad inhibitoria in vitro de los medicamentos) mediante la comparación del estado de activación de los neutrófilos tratados y no tratados, para evaluar la capacidad de los neutrófilos tratados con dicho modulador y/o medicamento para luchar contra los microorganismos y/o para destruirlos, para evaluar la capacidad o habilidad de defensa natural de un mamífero para luchar contra los microorganismos y para detectar o seleccionar compuestos que interactúan con mieloperoxidasa (MPO).

20 La Solicitud de Patente internacional W02005/075986 describe también el uso de procedimientos ELISA y SIEFED y kits para distinguir entre la mieloperoxidasa total y la activa (contenido de MPO). No obstante, este documento no describe ni sugiere que la detección de MPO se pueda obtener a través de tales procedimientos en un bioensayo o procedimiento combinados con el mismo apoyo sólido con el mismo anticuerpo de unión o porción de anticuerpo.

### Objeto de la invención

25 La presente invención apunta a proporcionar un kit para realizar un bioensayo que no incluye los inconvenientes de la técnica y que permite medir la fracción activa y la cantidad total de una enzima en la misma muestra, en forma secuencial, con el mismo anticuerpo primario, con el mismo apoyo sólido.

30 Uno de los principales objetos de la presente invención es proporcionar un kit para bioensayos para utilizar en mediciones combinadas de la fracción enzimáticamente activa y la cantidad total de varios tipos de enzimas que participan en diferentes patologías, como cardiopatías y cáncer, preferiblemente enzimas como las que se encuentran en la arteriosclerosis.

35 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el kit de detección para bioensayos que reduce las demoras en la detección y el número de compuestos reactivos utilizados (en especial, el número de anticuerpos primarios utilizados, el número de apoyos sólidos utilizados y el número de enzimas purificadas para obtener la curva de calibración).

Un último objeto de la presente invención es proponer un kit para bioensayos que permita la automatización de este bioensayo de detección y procedimiento en particular, permitiendo una medición simultánea de la activación de la fracción activa y cantidad total de diferentes tipos de enzimas, posiblemente presentes simultáneamente en la misma muestra biológica.

### Definiciones

El acrónimo ELISA significa "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas" y el acrónimo SIEFED significa "extracción inmunitaria específica seguida de una detección enzimática".

45 La frase "medición secuencial de la fracción enzimáticamente activa y la cantidad total de una enzima presentes en una muestra biológica" significa un procedimiento de detección que, luego de unir la enzima en el anticuerpo primario inmovilizado permite medir la fracción enzimáticamente activa de una enzima (es decir, la detección se realiza en la enzima activa a través de la medición de la actividad enzimática con la adición de un sustrato y cosustrato adecuados) seguida de la medición de la cantidad total de la enzima que se aplica en la enzima activa o inactiva. El término "medición" significa detección y una posible cuantificación. La expresión 'inhibidor de la enzima' corresponde a un compuesto o agente que se combina con una enzima de modo de evitar la combinación normal entre sustrato y enzima y la reacción catalítica.

50

**Sumario de la invención**

5 La invención refiere a un kit que comprende medios y herramientas para realizar una "extracción inmunitaria específica seguida de una detección enzimática" (SIEFED) y un "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas" (ELISA) secuenciales para medir el estado de activación de una enzima (1) o células que puedan liberar la enzima en una muestra biológica obtenida de un mamífero, o medir los efectos de compuestos sintetizados o naturales en la enzima, que comprende:

- un anticuerpo primario (2) o porción hipervariable del mismo, ambos específicos para la enzima (1) y unidos a una superficie de apoyo sólido (3),
  - un sustrato adecuado para que la enzima lo transforme en un producto de reacción visible y
  - 10 - un anticuerpo secundario (4) o una porción hipervariable del mismo, ambos específicos para esta enzima, en los que el primer y el segundo anticuerpo no presentan reacción cruzada entre sí,
  - reactivos adecuados para detectar un complejo anticuerpo primario (2)-enzima (1)- anticuerpo secundario (4) fijado en el apoyo sólido (3),
  - 15 - una muestra de la enzima pura (1) con una actividad enzimática determinada y una cantidad total determinada, que se utilizará para establecer las curvas de referencia del procedimiento SIEFED, y luego ELISA;
- caracterizado porque el kit comprende solo una superficie de apoyo sólido (3).

En una realización adicional, el kit conforme a la invención es adecuado preferiblemente para mamíferos, preferiblemente un caballo o un humano.

20 En otra realización, el kit de la invención comprende un anticuerpo secundario o porción hipervariable del mismo, que está marcado, preferentemente mediante un acoplamiento a una enzima.

Otro aspecto de la presente memoria refiere a un procedimiento in vitro para realizar una medición (secuencial) de (primero) una fracción enzimáticamente activa y (segundo) una cantidad total de enzima (1) en una misma muestra biológica compleja. El procedimiento es un procedimiento SIEFED seguido de un procedimiento ELISA, y este procedimiento "SIEFED-ELISA combinado" se realiza con el mismo anticuerpo primario (2) o porción hipervariable del mismo, ambos específicos para la enzima, que están unidos a la misma superficie sólida (3) y en el que el procedimiento SIEFED y procedimiento ELISA se realizan en forma secuencial en la misma superficie de apoyo sólido (3) con el mismo anticuerpo primario.

25 El procedimiento se basa en una muestra biológica obtenida de un mamífero, que contiene la enzima (1) o células que pueden liberar esta enzima y comprende el paso posterior de:

30 1) inmunocapturar la enzima (1) presente en la muestra biológica a través de un anticuerpo primario (2) específico (policlonal o monoclonal) o una porción hipervariable del mismo, ambos específicos para la enzima (1) y unidos a la superficie de apoyo sólido (3),

35 2) posiblemente extraer, mediante un primer paso de lavado, cualquier compuesto que interfiera con la medición de la actividad enzimática de la enzima inmunocapturada en la superficie de apoyo sólido (3) a través del anticuerpo primario (2) o una porción del mismo,

3) obtener, a través de una detección SIEFED y/o cuantificación mediante detección y/o medición de la actividad de la enzima (1) inmunocapturada, un valor medido de la actividad enzimática.

40 4) posiblemente comparar el valor medido de la actividad enzimática con valores normales de actividades enzimáticas obtenidos de un número significativo de mamíferos sanos y opcionalmente cuantificar un valor (nivel) de actividad enzimática mediante una curva enzimática estándar,

5) posiblemente extraer, mediante un segundo paso de lavado, cualquier sustrato y compuesto que se utilicen para, o resulten de, los pasos de detección del procedimiento SIEFED y que estén presentes en la solución de la enzima (1) inmunocapturada,

45 6) obtener, a partir de una detección ELISA, una cantidad medida total de enzima mediante la detección y/o medición de la cantidad total (activa e inactiva) de la enzima (1) presente en una muestra biológica, a través de la adición de un anticuerpo secundario (4) (policlonal o monoclonal) o una porción del mismo, para detectar la enzima (1) inmunocapturada por el anticuerpo primario (2) o una porción del mismo,

7) posiblemente comparar la cantidad medida total de enzima con una cantidad (nivel) normal total de enzima obtenida de un número significativo de mamíferos sanos,

8) opcionalmente cuantificar la cantidad (nivel) total de enzima mediante el uso de una curva enzimática estándar y posiblemente relacionar la cantidad (nivel) medida total de enzima con el estado de activación de la(s) célula(s) que liberan la enzima en relación con la presencia, ausencia o situación de una enfermedad o estado inmunológico,

5 9) posiblemente calcular una relación entre enzimas totales y enzimas activas en una muestra biológica y comparar esta relación con una relación normal obtenida de un número significativo de mamíferos sanos, o relacionar esta relación con un estado de activación de la enzima vinculado a un estado de una enfermedad.

10 En el procedimiento descrito, el paso de obtener la detección y/o cuantificación del procedimiento SIEFED mediante la detección y/o medición de la actividad enzimática se obtiene mediante la adición de un sustrato (8) específico que será transformado por la enzima (1) en un producto de reacción visible (preferentemente fluorescente) (etiqueta detectable).

El procedimiento divulgado se adapta preferentemente a una muestra biológica obtenida de un mamífero, preferiblemente un caballo o un humano.

En el procedimiento, la enzima se selecciona preferiblemente del grupo conformado por mieloperoxidasa, proteasas (tripsina, elastasa...), NADPH oxidasa, glutatión peroxidasa, óxido nítrico sintasa, catalasa o colagenasas.

15 En el procedimiento, el apoyo sólido (3) es una placa con múltiples pocillos.

En el procedimiento, el anticuerpo secundario (4) se marca, preferiblemente mediante un acoplamiento a una enzima (que tiene una actividad que puede transformar un sustrato en una etiqueta detectable).

20 La presente invención refiere a un kit para la medición secuencial de la fracción enzimáticamente activa y la cantidad total (cantidad activa y posiblemente inactiva) de una enzima presente en una muestra biológica, que se basa en un procedimiento y bioensayo de detección combinado SIEFED-ELISA; donde dicha detección se realiza luego de capturar la enzima (activa e inactiva) con el mismo anticuerpo primario unido al mismo apoyo sólido (superficie), donde el anticuerpo primario se dirige contra la enzima. Los inventores han descubierto inesperadamente que estos dos procedimientos (SIEFED-ELISA) (que parecen ser opuestos entre sí) se pueden combinar eficientemente y lograr una calibración eficiente en la misma curva de calibración o estándar con el uso del mismo anticuerpo primario unido a un apoyo sólido. Más aun, los inventores han observado inesperadamente que, en estos dos pasos combinados, se podría utilizar el mismo anticuerpo primario unido al mismo apoyo sólido. De hecho, los inventores han observado inesperadamente que el anticuerpo primario unido a un apoyo sólido no se ve afectado por los pasos de lavado utilizados en los dos procedimientos y se puede mantener en el apoyo sólido con la enzima de unión.

30 Como la técnica secuencial para la mieloperoxidasa (procedimiento SIEFED seguido de ELISA) se realiza con los mismos anticuerpos primarios recubiertos en una placa de múltiples pocillos, el procedimiento y kit de la invención

- permiten economizar anticuerpos primarios,

- permiten economizar apoyo sólido (placa con múltiples pocillos),

- permiten economizar la proteína pura de referencia (mieloperoxidasa) utilizada para establecer las curvas (de referencia) estándares,

35 - permiten ahorrar tiempo: solo se necesita una dilución de las muestras y otra en la repartición de las muestras en los pocillos.

Además, el procedimiento descrito y el kit de la invención

- permiten economizar reactivos (amortiguador de dilución).

40 - aseguran un mayor nivel de precisión en la medición de mieloperoxidasa mediante los procedimientos SIEFED y ELISA para una misma muestra (los anticuerpos primarios y la muestra de referencia o desconocida son idénticos para las dos mediciones; se excluyen las variaciones debidas a una pequeña diferencia en la concentración de anticuerpos o en el volumen de la muestra a medir).

- esta característica es importante para establecer la relación total entre la MPO y la MPO activa para una muestra dada.

45 El procedimiento descrito es un procedimiento in vitro para medir en forma secuencial (en pasos sucesivos) la fracción enzimáticamente activa y la cantidad total de una o más enzimas, preferiblemente mieloperoxidasa (MPO), que comprende los siguientes pasos:

1) obtener una muestra biológica, preferiblemente una muestra biológica de un mamífero, como un caballo o un humano, que contenga dicha(s) enzima(s) [o células que puedan liberar dicha(s) enzima(s)],

- 2) inmunocapturar dicha(s) enzima(s), presente(s) en la muestra biológica, mediante un anticuerpo primario específico (policlonal o monoclonal) para la enzima o una porción hipervariable del mismo, ambos específicos para la(s) enzima(s) y unidos a la superficie de apoyo sólido.
- 5 3) posiblemente extraer, mediante un (primer) paso de lavado, cualquier compuesto que interfiera con la medición de la actividad de la enzima inmunocapturada por el anticuerpo primario (o porción del mismo).
- 4) obtener un valor medido de la actividad enzimática a partir de la detección y/o cuantificación del procedimiento SIEFED mediante la detección y/o medición de la actividad enzimática, preferiblemente mediante la adición de un sustrato específico que será transformado por la enzima en un producto de reacción visible (preferiblemente fluorescente).
- 10 5) posiblemente comparar dicho valor medido de la actividad enzimática con un valor normal de actividad enzimática (es decir, estándar de referencia o valores (niveles) enzimáticos estándares preestablecidos utilizados como referencia) que se obtiene de un número significativo (más de 10, preferiblemente más de 50, más preferiblemente más de 200 o 1.000 individuos) de mamíferos "sanos", preferiblemente caballos o humanos (es decir, mamíferos que presentan valores (niveles) enzimáticos normales y no presentan los siguientes síntomas o enfermedades) u,
- 15 opcionalmente, cuantificar los niveles (valores) de actividad enzimática a través de una curva enzimática estándar,
- 6) posiblemente eliminar, mediante un (segundo) paso de lavado, cualquier sustrato presente en la enzima inmunocapturada,
- 7) obtener a partir de una detección ELISA (paso del procedimiento ELISA) una cantidad medida total de enzima (nivel o valor), mediante la detección y/o medición de la cantidad total (activa e inactiva) de la enzima presente en la
- 20 muestra biológica, preferiblemente mediante un anticuerpo secundario (policlonal o monoclonal) o una porción hipervariable del mismo, para detectar la enzima inmunocapturada (a través del anticuerpo primario o porción hipervariable del mismo), donde el anticuerpo secundario o porción del mismo son específicos para la enzima inmunocapturada y, posiblemente, se marcan mediante un acoplamiento a una enzima secundaria de "detección" que es diferente de la primera enzima que se detectará (anticuerpo secundario marcado).
- 25 8) posiblemente comparar la cantidad medida total de enzima (niveles o valores) obtenida con las cantidades de enzima normales (niveles o valores) obtenidas de un número significativo de mamíferos "sanos", preferiblemente caballos o humanos sanos.
- 9) opcionalmente cuantificar la cantidad de enzima (niveles o valores) mediante el uso de curva(s) enzimática(s) estándar(es) y
- 30 10) posiblemente relacionar las fracciones enzimáticamente activas de la(s) enzima(s) medida(s) a través de un procedimiento SIEFED, la cantidad total (niveles o valores) de la(s) enzima(s) medida(s) mediante el procedimiento ELISA y las tasas calculadas de la fracción enzimáticamente activa, con la cantidad total (nivel o valor) con el estado de activación de la(s) enzima(s) o las células que liberan la(s) enzima(s) y que es indicativa de la presencia, ausencia o situación de una enfermedad o estado inmunológico.
- 35 La presente invención se relaciona con un kit que comprende medios y herramientas para medir el estado de activación de una o más enzimas presentes en una muestra biológica o células que pueden liberar dicha(s) enzima(s) en la muestra biológica (que se obtienen de un mamífero, preferiblemente de un caballo o humano) que permite la medición secuencial descrita precedentemente y una cuantificación a partir de una curva de calibración o estándar.
- 40 El kit combinado es un kit SIEFED-ELISA combinado para medir en forma secuencial la fracción enzimáticamente activa y el contenido total de enzimas (activas e inactivas), en el cual la fracción y el contenido se correlacionan con un posible estado de activación de las células.
- El kit combinado comprende los elementos necesarios para obtener una inmunocaptura de la enzima que está presente en la muestra biológica, mediante un anticuerpo primario (policlonal o monoclonal) que reconoce la enzima,
- 45 o una porción del mismo, ambos específicos para dicha enzima y unidos a la superficie de apoyo sólido.
- De manera ventajosa, este kit combinado comprende además un sustrato específico que la enzima transformará en un producto de reacción visible (preferiblemente un producto de reacción fluorescente) para detectar la fracción enzimáticamente activa de la enzima inmunocapturada y un anticuerpo secundario (posiblemente marcado) (policlonal o monoclonal) (o una porción del mismo) para detectar la cantidad (nivel o valor) total de enzima
- 50 inmunocapturada a través del anticuerpo primario.
- Preferentemente, este kit combinado comprende adicionalmente una muestra de enzima de referencia calibrada (para la actividad enzimática y la cantidad total) para usar a efectos de establecer las curvas de referencia. Más aún, el kit puede comprender además datos, posiblemente presentados en una base de datos o gráficos (curva de calibración o estándar), relacionados con la cantidad (niveles o valores) normal (enzimáticamente activa o total) de
- 55 enzima, que se obtienen de un número significativo (más de 10, preferiblemente más de 50, más preferiblemente

más de 200 o 1.000 individuos) de mamíferos "sanos", preferiblemente caballos o humanos (es decir, mamíferos con niveles de MPO normales y que no presenten los síntomas o las enfermedades que se describen más adelante).

5 Estos niveles normales de enzimas se presentan ventajosamente en una curva estándar de MPO o se reúnen en una base de datos. Por tanto, el kit o dispositivo puede comprender además estas bases de datos guardadas en una computadora (con el programa adecuado) para comparar la enzima medida (niveles o valores) con la cantidad normal de enzima (niveles o valores) a través de un procedimiento conocido para los expertos en la técnica y relacionar las enzimas medidas (niveles o valores) con un estado de actividad de la enzima o un estado de activación de las células que liberan la enzima, donde el estado es, posiblemente, indicativo de la presencia, ausencia o situación de una enfermedad o estado inmunológico de sujetos mamíferos, preferiblemente caballos o humanos.

En el procedimiento descrito y el bioensayo, o kit conforme a la invención, la enzima se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), o una enzima marcadora de una patología inflamatoria o una cardiopatía (preferiblemente, patología arteriosclerótica) o cáncer.

15 Preferiblemente, la enzima se selecciona del grupo conformado por proteasas (tripsina, elastasa...), NADPH oxidasa, glutatión peroxidasa, óxido nítrico sintasa, catalasa o colagenasas.

En el procedimiento descrito y el kit conforme a la invención, el apoyo sólido es, preferiblemente, una placa con múltiples pocillos, preferiblemente una placa con múltiples pocillos recubierta con estreptavidina que permite la unión del anticuerpo primario (o una porción del mismo) con la superficie. Preferiblemente, el recubrimiento es suficiente para evitar la extracción del anticuerpo primario recubierto luego del(de los) pasos de lavado (primero y/o segundo) utilizados para eliminar de la muestra biológica toda molécula que no esté unida al anticuerpo primario o una porción del mismo. Más aún, el recubrimiento también es suficiente para evitar la extracción del anticuerpo primario (o una porción del mismo) mediante un paso de lavado que se utiliza para eliminar el sustrato de enzima luego del paso de detección SIEFED y antes de la adición del anticuerpo secundario (marcado) que se utiliza además en el paso de detección ELISA.

25 Además, el kit conforme a la invención también puede comprender cualquier otro medio o herramienta utilizado para llevar a cabo la detección combinada conforme a la invención, como nitrito(s) que se agrega(n) al medio de reacción para amplificar la reacción enzimática, preferiblemente la reacción enzimática de la peroxidasa, más preferiblemente para mejorar la señal de fluorescencia inducida por 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina.

30 Se descubrió que la sensibilidad de detección de los pasos del procedimiento SIEFED se podría aumentar significativamente mediante la adición de nitritos que mejoran significativamente la fluorescencia. La cantidad preferida de nitrito ( $\text{NO}_2^-$  para agregar a la mezcla de reacción) se encuentra entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,7 mg/ml y preferiblemente es de aproximadamente 0,2 mg/ml. El nitrito se agrega preferiblemente en forma de sal como una sal de Na o cualquier otra sal alcalina o alcalina de la tierra (como sales de Li, K, Rb, Cs, Be, Mg, Ca, Sr), excepto las sales tóxicas (como, presumiblemente, sales de Ba, Ra o Fr). La amplificación de la señal de detección hace posible medir y detectar en forma precisa la actividad enzimática de una enzima, por ejemplo, la de la MPO que se origina de los neutrófilos, en los medios, tejidos o muestras (biológicos) más complejos.

40 En particular, la sensibilidad de la detección enzimática se aumentó al menos al doble, preferiblemente al menos cinco veces, más preferiblemente al menos 10 veces o 20 veces, mediante el uso de nitrito como potenciador de la actividad de la peroxidasa, lo que condujo a una mejor respuesta de la fluorescencia.

Esta técnica de mejoramiento de la fluorescencia se aplica con la misma eficacia para la detección de otras actividades de la peroxidasa, y es aplicable no solo a los procedimientos de SIEFED, kits y dispositivos descritos, sino a cualquier procedimiento de detección o kit (médico o industrial) que pueda requerir el uso de una enzima de peroxidasa.

45 El kit conforme a la invención también puede comprender otros medios y herramientas bien conocidos, como una o más soluciones cromógenas, amortiguadoras, de marca y de lavado. Más aun, el kit o dispositivo conforme a la invención también puede comprender medios y herramientas de detección y/o registro de la(s) señal(es) obtenida(s) con la(s) marca(s) utilizada(s).

50 La muestra o el medio biológico es, preferiblemente, un fluido biológico (posiblemente purificado) obtenido de un mamífero (preferiblemente un caballo o un humano) o un medio de cultivo, u obtenido de plantas con bacterias u hongos, incluidas células de levadura que pueden liberar la enzima. El fluido biológico podría ser un fluido biológico celular o un fluido biológico acelular. Este fluido biológico podría ser sangre venosa y capilar, suero o plasma, líquido seminal, líquido broncoalveolar, líquido pleural, esputo, fluido nasal, fluidos ascíticos, líquido sinovial, muestras fecales e intestinales gástricas o líquido cefalorraquídeo.

55 La muestra o el medio biológico también podría ser un extracto obtenido de varios tejidos de un mamífero u otras muestras o medios biológicos complejos que también pueden comprender otras moléculas, como proteínas

(albúmina, lipoproteína) y agentes reductores que puedan interferir con una medición adecuada de las enzimas como se observa en las pruebas clásicas conocidas en la técnica.

5 Los procedimientos descritos también se aplican a algunos ensayos de diagnóstico específicos que ya se han propuesto para caballos o humanos, como la detección de enfermedades de origen inflamatorio, que pueden afectar al mamífero, en especial un caballo o un humano.

En una realización preferida conforme a la presente invención, el kit (o dispositivo) es un kit de partes (posiblemente que comprenda diferentes partes de los elementos para llevar a cabo los pasos del procedimiento).

Las posibles aplicaciones del procedimiento combinado SIEFED-ELISA descrito y el kit conforme a la invención son las siguientes:

- 10 - evaluación rápida de la intensidad de la activación de las células (neutrófilos) y reacción inflamatoria generalizada o local, en patologías inflamatorias agudas o crónicas (como arteriosclerosis, sepsis, choque séptico, patologías inflamatorias pulmonares, patologías intestinales, laminitis).
- seguimiento eficiente y rápido de la activación de las células (neutrófilos) durante la terapia (estudio de los efectos de los medicamentos administrados al mamífero (preferiblemente un caballo o un humano), tomando muestras del mismo individuo o mamífero enfermo (preferiblemente un caballo o un humano) en diferentes intervalos de tiempo, mediante las cuales el estado de activación de los neutrófilos se puede seguir con el paso del tiempo.
- 15 - diagnóstico temprano o previsión de algunas patologías.
- rápida evaluación de la capacidad de los neutrófilos para destruir microorganismos (evaluación en neutrófilos aislados), prueba que se aplicará en patologías inmunosupresoras.
- 20 - rápida evaluación de la capacidad o habilidad de defensa natural de un individuo o grupo de individuos contra las infecciones.
- rápida medición de enzimas capturadas por otras células (en relación con su capacidad para luchar contra microorganismos y/o destruirlos).
- 25 - rápido análisis y selección de compuestos, que posiblemente interactúan con la enzima y que posiblemente afectan la actividad de la enzima.

Por tanto, el kit conforme a la invención es preferiblemente un kit de detección sistemática de alto rendimiento que comprende elementos para medir, detectar y seleccionar compuestos activos. Dichos 'compuestos activos' son elementos seleccionados del grupo que consiste en moléculas sintetizadas química o biológicamente (incluidos anticuerpos), nuevas moléculas naturales purificadas, plantas con microorganismos o extractos de animales o una mezcla de los mismos. Estos compuestos son preferiblemente inhibidores de enzimas (inhibidores reversibles o irreversibles). Preferiblemente, el kit que se utiliza para detectar inhibidores de enzimas se basa en un procedimiento que comprende los siguientes pasos:

- incubar la enzima activa con uno o más posibles inhibidores,
- 35 - captar la enzima activa (preferiblemente a través de un anticuerpo específico para la enzima o una porción hipervariable del mismo) unida a un apoyo sólido, preferiblemente el apoyo sólido del kit SIEFED-ELISA conforme a la invención, y lavar los compuestos no unidos,
- posiblemente medir la actividad enzimática, preferiblemente a través del paso (parte) SIEFED del procedimiento SIEFED-ELISA descrito precedentemente,
- lavar para eliminar los reactivos después de llevar a cabo el paso SIEFED del procedimiento SIEFED-ELISA,
- 40 - posiblemente medir la cantidad total de enzima, preferiblemente a través del paso (parte) ELISA del procedimiento SIEFED-ELISA descrito precedentemente,
- posiblemente comparar la actividad enzimática y la enzima total antes o después de agregar uno o más posibles inhibidores.

45 Al examinar la capacidad de las células que no son neutrófilos para luchar contra los microorganismos y/o destruirlos, los bioensayos que se han descrito precedentemente luego se aplican a muestras que contienen otro tipo de células. A través de la comparación de los niveles de enzimas que se obtuvieron para dichas células con los niveles de enzimas de los neutrófilos de los individuos sanos, se puede estimar la capacidad o habilidad de dichas células para fijar o internalizar la enzima y, en consecuencia, luchar contra infecciones por microorganismos.

50 Las técnicas de detección descritas precedentemente (procedimiento, bioensayo, kits o dispositivos) también pueden encontrar usos ventajosos en el estudio de la eficacia de determinados medicamentos como los

inmunomoduladores. Los niveles de enzimas de las células (neutrófilos) que han estado en contacto con, por ejemplo, dichos inmunomoduladores luego se comparan con la cantidad (niveles o valores) de enzima de células (neutrófilos) no tratadas, donde dicha enzima (niveles o valores) es una indicación del estado de activación de las células (neutrófilos) y/o su capacidad para luchar y/o destruir microorganismos.

- 5 Los procedimientos de detección conforme a la invención son particularmente útiles en la predicción, el diagnóstico, posiblemente en una etapa muy temprana, y/o el seguimiento de una de las siguientes patologías o enfermedades: enfermedades inflamatorias, patologías digestivas, patologías intestinales con estrangulación, sepsis, choque séptico, patologías pulmonares crónicas y agudas (con invasión de neutrófilos en los alvéolos), patologías por isquemia-reperusión, patologías articulares (con presencia de neutrófilos en las articulaciones), cólicos, alergias, infecciones, enfermedades cardiovasculares y cáncer.

- 10 El procedimiento de detección descrito y el kit de bioensayo conforme a la invención también son particularmente útiles para la evaluación in vitro de la capacidad inhibitoria de los medicamentos (ya sean productos naturales obtenidos de extractos de planta o de origen animal, o moléculas recientemente sintetizadas) en la actividad enzimática, lo que permite distinguir entre un efecto neutralizador de dichos medicamentos en los productos de la actividad enzimática (actividad antioxidante estequiométrica) o una actividad inhibitoria directa en la propia función de la enzima (actividad anticatalítica).

En términos más generales, mediante la comparación de los niveles de actividad enzimática y los niveles de enzimas totales medidos a través de los pasos combinados SIEFED-ELISA, se puede probar la eficiencia de las técnicas de purificación de enzimas.

- 20 La presente invención se describirá en mayor detalle en la siguiente descripción de sus realizaciones preferidas en referencia a las figuras adjuntas.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y de modo no taxativo.

**Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 representa dos curvas estándares o de calibración que se utilizan en el procedimiento descrito.

- 25 La Figura 2 representa el bioensayo combinado de la invención.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1 - SIEFED-ELISA combinado para MPO humana**

**a) Preparación y purificación de anticuerpos de MPO humana**

- 30 Se generaron anticuerpos policlonales específicos contra la MPO humana en conejos y cobayos contra MPO humana pura, se purificaron por cromatografía de afinidad y se sometieron a prueba para observar la inmunorreactividad, a través de los mismos procedimientos que se describieron para la preparación y purificación de la MPO policlonal antiéquina.

**b) Técnica SIEFED-ELISA combinada para medir la MPO humana**

- 35 Los procedimientos utilizados son similares a los descritos para la técnica combinada SIEFED-ELISA de MPO equina, pero se utilizan anticuerpos policlonales anti-MPO humana específicos (IgG de conejo para el anticuerpo primario e IgG de cobayo para el anticuerpo secundario).

**c) Calibración con MPO humana**

Las curvas de calibración para la técnica SIEFED-ELISA combinada se obtuvieron con MPO humana estándar:

- 40 - como se utiliza en el laboratorio CORD: una solución concentrada (100µg/ml) de MPO humana (Calbiochem) en una solución amortiguadora de acetato de sodio de 0,2M, se mantiene un pH 5,5 en fracciones alícuotas a -20°C. La solución concentrada se diluye con un amortiguador de dilución para alcanzar una concentración de 50 ng/ml de MPO (concentración del Calibrador 7 (Cal 7)). A partir del Cal 7, se obtienen las diluciones secuenciales hasta que se alcanza la concentración más baja de MPO para la curva: 0,78 ng/ml (Cal 1). El Calibrador 0 (Cal 0) = amortiguador de dilución.
- 45 - como se utilizó en el kit ELISA de Zentech para MPO humana: se preparan calibradores de MPO del kit ELISA conforme a las recomendaciones de Zentech. Las concentraciones de MPO son (en ng/ml: 0 (Cal 0); 0,6 (Cal 1); 2,1 (Cal 2); 11,7 (Cal 3); 22,4 (Cal 4); 78,5 (Cal 5). A estos calibradores se agregan dos referencias plasmáticas internas que tienen la siguiente concentración estimada de MPO total:

Control 1: 1,20 (0,80 ... 2,00) ng/ml

- 50 Control 2: 8,50 (6,30 ... 10,70) ng/ml



d) Dilución de la muestra

La dilución de la muestra se obtiene con el amortiguador de dilución proporcionado en el kit de Zentech. Las muestras biológicas se diluyen 20x para la dosis de la técnica SIEFED-ELISA combinada.

5 e) Curvas de las enzimas estándares para la técnica SIEFED-ELISA combinada

Se obtuvo una curva estándar de la enzima (MPO humana) correspondiente a la parte SIEFED de la técnica SIEFED-ELISA combinada luego de la revelación de la actividad enzimática, mediante una gráfica de los valores de fluorescencia en 590 nm como función de las concentraciones de las enzimas estándares. La curva estándar de la "parte SIEFED" permite cuantificar la fracción enzimáticamente activa de la MPO en una muestra biológica.

10 La curva estándar de la parte ELISA de la técnica SIEFED-ELISA combinada se obtuvo mediante la gráfica de los valores de absorbancia en 405 nm como función de las concentraciones de las enzimas estándares (ver figura 1). La curva estándar de la "parte ELISA" permite cuantificar la concentración total de MPO en una muestra biológica. La relación total entre la MPO y la MPO activa de la muestra biológica se obtiene a través de la relación de los dos valores leídos en las dos curvas estándares.

15 f) Análisis comparativo de la concentración de la fracción activa y la enzima total (MPO humana) medida en las muestras biológicas evaluadas: relación de concentraciones de la técnica SIEFED/ELISA.

La tabla 1 muestra la concentración de una enzima (MPO humana) (total y activa) medida en los controles del kit de Zentech, en los plasmas (P) y en el líquido broncoalveolar (Bal) de humanos.

20 A través del uso de un calibrador adecuado de MPO humana de CORD para la detección SIEFED-ELISA, los inventores han observado que las concentraciones de la enzima activa (MPO) siempre son inferiores (al menos 2 o 3 veces inferiores) que la concentración de la enzima total (MPO) en las muestras biológicas sometidas a prueba (ver tabla 1).

Tabla 1:

MPO Calibración CORD (Calbiochem)	MPO total ELISA (ng/ml)	MPO activa SIEFED (ng/ml)	MPO total/MPO activa
Control MPO 1	1,36	0,37	3,6
Control MPO 2	11,65	0,63	18,5
P5 20 x	58,30 ± 2,6	25,57	2,3
P6 20 x	35,25 ± 2,2	12,34	2,9
Bal De 20 x	13,76 ± 3,5	6,78	2,0
Bal Ha 20 x	≥ 50	10,41.55	≥ 5

25 Estos resultados muestran que el bioensayo SIEFED-ELISA (kit o dispositivo) para MPO humana es eficiente y permite medir en forma secuencial la fracción enzimáticamente activa y la cantidad total de MPO en la misma muestra biológica con el mismo anticuerpo primario (2) (o la misma porción hipervariable del mismo) fijado a una superficie de apoyo sólido (3). De hecho, los inventores han observado que la muestra biológica se puede utilizar con la misma dilución para las técnicas SIEFED y ELISA (20 x en el presente bioensayo). Esto significa que para la misma muestra diluida, solo el nivel de la fracción activa y la enzima total (MPO) se encuentran en concentraciones que se ajustan al límite de sensibilidad del bioensayo y las curvas de referencia, porque se pueden medir con el mismo factor de dilución mediante el uso del mismo material inmunológico (anticuerpo primario) y los mismos calibradores. Estas características ventajosas, por tanto, simplifican claramente los pasos de los procedimientos conforme a la invención en comparación con la realización de los bioensayos ELISA y SIEFED por separado.

35 Estos factores de dilución se podrían modificar conforme al tipo de enzima y conforme al tipo de muestra biológica.

**Ejemplo 2: SIEFED-ELISA combinada para MPO equina**

a) Preparación y purificación de anticuerpos de MPO equina

La producción de anticuerpos policlonales se describe en la publicación WO2005/07598 que se incorpora a la presente como referencia.

40 Los anticuerpos producidos reconocen eficientemente la enzima (MPO)

b) Técnica SIEFED-ELISA combinada para medir la MPO equina liberada por neutrófilos activos.

La técnica SIEFED es una técnica de inmunodetección que consta de dos pasos:

- captación de una enzima (como MPO) (1) de muestras biológicas a través de un anticuerpo primario específico (2) recubierto en un apoyo sólido (3), seguida de
- detección enzimática de la enzima (como MPO) (1) inmovilizada (fijada) en el anticuerpo primario recubierto en el apoyo sólido.

5 A diferencia de los pasos de la técnica (parte) ELISA de la prueba combinada, la técnica (parte) SIEFED mide solo la enzima activa (MPO).

10 El anticuerpo primario (2), que capta la enzima (MPO 1), es IgG de conejo (3µg/ml). La enzima estándar (MPO) o muestra desconocida se incuba 2 h a 37°C. Después del lavado, se detecta la actividad (peroxidasa) de la enzima (MPO) mediante el agregado de 100 µl de una solución de 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 40 µM de Amplex® Red (8) (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina; de Molecular Probes) en una solución amortiguadora de fosfato (50 mM, pH 7,5). Se lee la fluorescencia durante 30 minutos (a 37°C) en 590 nm con un fluorímetro Fluoroskan Ascent (Labsystems). Los volúmenes del anticuerpo primario (2) y la muestra colocada en los pocillos son de 200 µl. Los controles (en blanco) y las diluciones de las muestras se establecen con un amortiguador de dilución.

15 Se obtuvo una mejor fluorescencia cuando se agregó una concentración definida de iones nitritos (aproximadamente 10 mM) a la solución Amplex® Red (8). La respuesta de fluorescencia obtenida en los pasos (parte) SIEFED del bioensayo combinado SIEFED-ELISA es directamente proporcional a la fracción enzimáticamente activa de la enzima (MPO equina) presente en la muestra.

20 Luego de la detección SIEFED, se llevó a cabo un lavado (solución de NaCl al 0,9 % con Tween-20 al 0,1 %) antes de comenzar la parte ELISA del procedimiento combinado; el complejo inmovilizado del anticuerpo (2) y el antígeno (1) se incubó (2 horas, 37°C) con un exceso (5 µg/ml) de IgG de cobayo y el anticuerpo secundario (4). Luego del lavado, se agrega un tercer anticuerpo (5) producido contra la IgG de cobayo. Esta tercera IgG (5) (IgG de cabra) se marca con una fosfatasa alcalina (6) y reconoce el complejo "sandwich" de "anticuerpo primario (2)-MPO(1)-anticuerpo secundario" (4). Luego del lavado, se detecta la actividad de la fosfatasa a través de la incubación (30 minutos a 37°C, en la oscuridad) con una solución de paranitrofenilfosfato (sustrato de fosfatasa, Sigma). La reacción se detiene con NaOH y se mide la absorbancia (405 nm) con un lector Multiscan Ascent (Labsystem). Todos los volúmenes agregados a los pocillos comprenden 100 µl, excepto el lavado (300 µl) y la solución de sustrato (200 µl). Los controles (en blanco) y las diluciones de la enzima estándar (MPO) y las muestras se establecieron con un amortiguador de dilución [PBS (20 mM fosfato, 137 mM NaCl y 2,7 mM KCl, pH 7,4) a los cuales se agregó 5g/L de albúmina de suero bovino y Tween-20 al 0,1 %].

30 La respuesta de absorbancia obtenida de la parte ELISA del procedimiento combinado es directamente proporcional a la cantidad del complejo sandwich formado; en otras palabras, a la concentración total de la enzima (MPO) en la muestra.

#### c) Curvas de las enzimas estándares para el bioensayo de la técnica SIEFED-ELISA combinada para MPO equina

35 Se obtuvo una curva estándar de la enzima (MPO equina) correspondiente a los pasos (parte) SIEFED de la técnica combinada SIEFED-ELISA mediante la gráfica de los valores de fluorescencia en 590 nm como función de las concentraciones de las enzimas estándares y correspondiente a los pasos (parte) ELISA de la técnica combinada SIEFED-ELISA mediante la gráfica de los valores de absorbancia en 405 nm como función de las concentraciones de las enzimas estándares (MPO). Las curvas estándares son las clásicas, que alcanzan una meseta para las concentraciones más altas de la enzima (MPO). Las curvas lineales se obtienen cuando las concentraciones de la enzima (MPO) se expresan en la forma logarítmica. Una tabla (ver WO2005/075986) indica los valores de fluorescencia y absorbancia con desviaciones estándares y coeficientes de variación intra ensayo (CV en %) para la curva de referencia de SIEFED y ELISA de la técnica combinada SIEFED-ELISA.

45 Las curvas estándares de la enzima (MPO) permiten cuantificar la fracción enzimáticamente activa de la enzima (curva estándar SIEFED) y la cantidad total de la enzima (MPO) (curva estándar ELISA). La tasa de enzima activa total se obtiene a través de la tasa de los valores de las curvas estándares respectivas. Esta cuantificación ofrece ventajas en cuanto al monitoreo del avance de la enfermedad. Mediante la comparación de la media del nivel de la enzima activa y total (MPO) de individuos sanos y enfermos, se puede establecer los valores de corte que permiten la distinción entre mamíferos sanos y enfermos. Preferiblemente, los valores de corte se establecen para las diferentes muestras biológicas sometidas a ensayo para obtener los niveles de la enzima (MPO) de la célula.

50 La adición de iones nitritos (aproximadamente 10 mM) en forma de sales (sal de sodio) al medio de reacción podría mejorar hasta multiplicar por diez la sensibilidad de los pasos (parte) SIEFED del bioensayo SIEFED-ELISA.

#### d) Bioensayo combinado SIEFED-ELISA para MPO equina desarrollado que permite detectar la enzima en muestras complejas como plasma y sobrenadante de neutrófilos activados

55 Se detectaron los niveles de enzima (MPO) total y activa en muestras biológicas que consisten en plasma de sangre anticoagulada en EDTA, ya que, como se demostró previamente, el EDTA fue el mejor anticoagulante para evitar la

desgranulación in vitro de neutrófilos en la muestra de sangre y valores artefactuales de concentraciones de MPO activa y total.

Se establecieron los coeficientes de variación intra e inter ensayo (que dan fe de la precisión de la técnica) para el plasma extraído de caballos sanos y caballos con patologías inflamatorias.

- 5 Se observaron las concentraciones más altas de enzima (MPO) total y activa en plasma de caballo con patologías intestinales con estrangulación.

Se observó una importante liberación de enzima (MPO) total con una fracción variable de enzima enzimáticamente activa en el sobrenadante de neutrófilos excitados en comparación con los no excitados.

- 10 Lo que antecede demuestra que el bioensayo combinado SIEFED-ELISA de la presente invención es sensible, exacto y claramente capaz de plantear una distinción entre animales sanos y patológicos. Asimismo, demuestra que la medición de la enzima (MPO) total y activa del plasma puede ser una prueba de la activación de las células (neutrófilos) y tiene una correlación positiva con determinadas patologías.

La prueba combinada también se aplicó con éxito a líquidos peritoneales y seminales.

e) Sensibilidad y precisión del bioensayo combinado SIEFED-ELISA desarrollado

- 15 La sensibilidad del ensayo combinado es de aproximadamente 1 ng/ml, con buenas precisiones intra e inter ensayo para las curvas estándares (menor al 8%) y muestras biológicas (en general, menor al 10%).

Ejemplo 3 – Técnica combinada SIEFED-ELISA para estudiar los efectos de los polifenoles naturales, la curcumina y la tetrahidrocurcumina (THC) en neutrófilos equinos activados

- 20 Se contaron los neutrófilos aislados de la sangre citratada de caballos sanos, se suspendieron en una solución salina amortiguada por fosfato (PBS) con un pH de 7,4 y se incubaron durante 10 minutos a 37°C con curcumina o THC a una concentración final de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  o  $10^{-6}$  M. Luego de la incubación y el centrifugado ( $1.000 \times g$ , 10 minutos), los neutrófilos se volvieron a suspender en PBS y se activaron durante 30 minutos con  $8 \times 10^{-7}$  M de acetato de forbol miristato (PMA) seguido de un centrifugado y medición de la enzima (MPO) total y activa en el sobrenadante mediante el bioensayo específico combinado SIEFED-ELISA. Se estudiaron los efectos de los polifenoles en la fracción total y activa de la enzima (MPO) liberada por los neutrófilos estimulados mediante la preincubación de los neutrófilos con los medicamentos a diferentes concentraciones, antes de la estimulación de los neutrófilos.

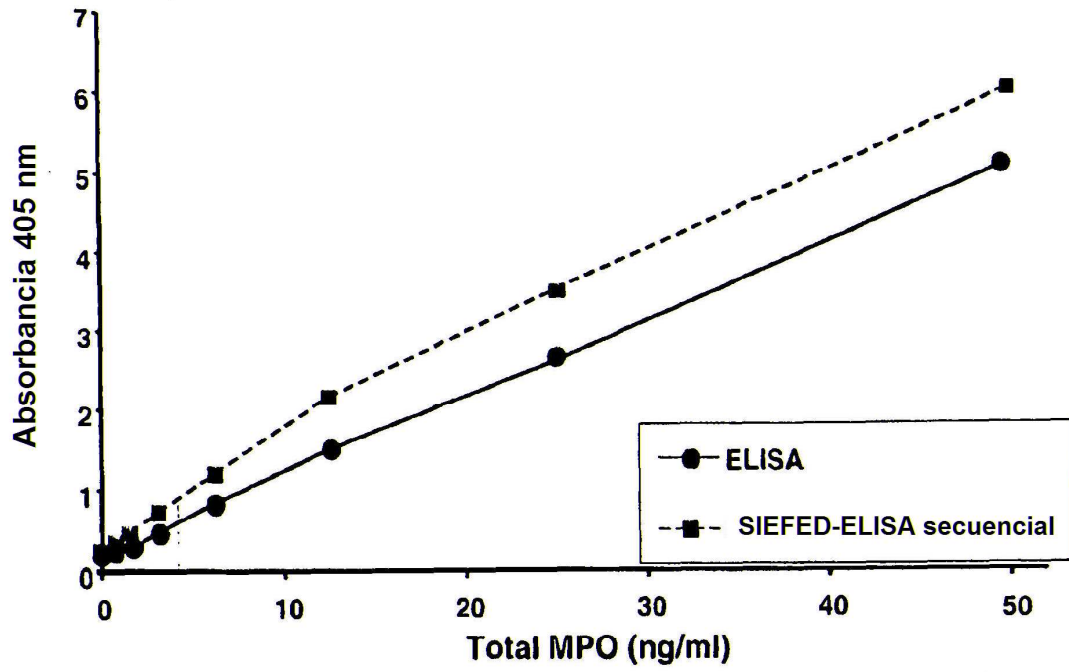
- 30 Tanto la curcumina como la THC presentaron efectos inhibitorios dependientes de la dosis administrada en la enzima total y en la fracción activa de la enzima (MPO) liberada por los neutrófilos activados. Los porcentajes de inhibición fueron del 44% y el 60 % para la curcumina ( $10^{-5}$  M) y del 18% y el 22% para la THC ( $10^{-5}$  M) en la enzima (MPO) total liberada y en la actividad de la MPO, respectivamente. Estos efectos inhibitorios de la curcumina presentan perspectivas terapéuticas en patologías equinas con reacciones inflamatorias excesivas.

- 35 La actividad enzimática de la enzima (MPO) produce HOCl (ácido hipocloroso) o NaOCl (hipoclorito de sodio) y otras especies oxidantes potencialmente tóxicas si la enzima actúa directamente en contacto con los tejidos o dentro de las células, es decir, en lugares que no sean el fagolisosoma. La enzima (MPO) puede estar presente en fluidos biológicos en forma inactiva (inhibición por oxidación o inhibidores específicos). Resulta interesante distinguir la enzima (MPO) activa de la forma inactiva en las muestras biológicas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un kit que comprende medios y herramientas para realizar una "extracción inmunitaria específica seguida de una detección enzimática" (SIEFED) y un "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas" (ELISA) secuenciales para medir el estado de activación de una enzima (1) o células que puedan liberar la enzima en una muestra biológica obtenida de un mamífero, o medir los efectos de compuestos sintetizados o naturales en dicha enzima y que comprende:
- un anticuerpo primario (2) o porción hipervariable del mismo, ambos específicos para la enzima (1) y unidos a una superficie de apoyo sólido (3),
  - un sustrato adecuado para que la enzima lo transforme en un producto de reacción visible y
  - 10 - un anticuerpo secundario (4) o una porción hipervariable del mismo, ambos específicos para dicha enzima, en el que el primer y el segundo anticuerpo no presentan reacción cruzada entre sí,
  - reactivos adecuados para detectar un complejo anticuerpo primario (2)-enzima (1)-anticuerpo secundario (4), fijado en el apoyo sólido (3),
  - una muestra de la enzima (1) pura con una determinada actividad enzimática y una determinada cantidad total que se utilizará para establecer las curvas de referencia del procedimiento SIEFED y ELISA;
  - 15 - **caracterizado porque** solamente hay una superficie de apoyo sólido (3) presente.
- 2.- El kit de la reivindicación 1, en el que el mamífero es un caballo.
- 3.- El kit de la reivindicación 1, en el que el mamífero es un ser humano.
- 4.- El kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo secundario o la porción hipervariable del mismo está marcado.
- 20 5.- El kit de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo secundario o la porción hipervariable del mismo está marcado por un acoplamiento a una enzima.

25



**FIG. 1**

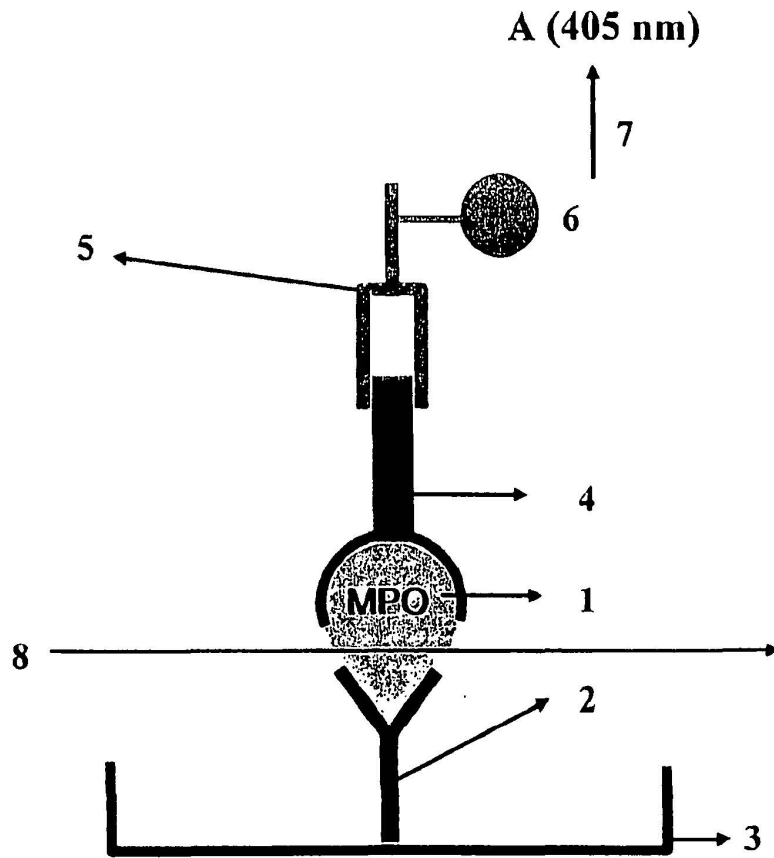


FIG. 2