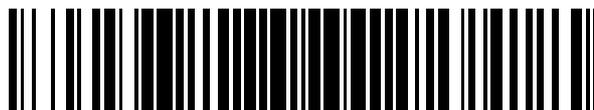


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 995**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/37 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08788448 .2**
96 Fecha de presentación: **26.08.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2185722**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2010**

54 Título: **Dispositivo de detección de enzimas**

30 Prioridad:
23.08.2007 GB 0716492

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.11.2012

73 Titular/es:
MOLOGIC LTD (100.0%)
Colworth Science Park
Sharnbrook, Beds MK44 1LQ , GB

72 Inventor/es:
DAVIS, PAUL, JAMES

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 390 995 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

Dispositivo de detección de enzimas

5 La presente invención se refiere a un dispositivo de detección de enzimas y, más específicamente a un dispositivo de detección de enzimas para detectar una enzima capaz de modificar un sustrato proporcionado que es reconocible mediante una molécula de unión específica en su estado no modificado. La invención también se refiere a un procedimiento de detección de una enzima capaz de modificar un sustrato.

10 Existen muchas situaciones clínicas y experimentales, en las que es útil poder detectar la presencia, en una muestra, de una enzima que tiene una actividad catalítica particular. Un ejemplo de este tipo de enzima es una proteasa, la cual digiere proteínas por hidrolización y escisión de enlaces peptídicos. Por lo tanto, una proteína que es degradada por una proteasa se escinde en dos o más péptidos más pequeños. Otro ejemplo es una sialidasa, la cual escindiría un resto de ácido siálico de un carbohidrato más grande.

15 En el documento US2006/0003394 se divulga un kit de ensayo diagnóstico que detecta una enzima en una muestra. El kit comprende "complejos reactivos", los cuales comprenden cada uno de ellos un ligando diana unido a un marcador y un miembro de unión específico. El ligando diana es escindible por la enzima que se va a detectar con el fin de liberar el marcador. La mezcla de los complejos reactivos y la muestra se aplica posteriormente a un medio cromatográfico. El medio cromatográfico comprende una primera zona de detección, la cual es capaz de capturar el miembro de unión específico en el ligando diana y una segunda zona de detección, la cual es capaz de unirse al marcador. Por consiguiente, durante el uso, la mezcla de la muestra y los complejos reactivos se aplican al medio cromatográfico y fluye primero a través de la primera zona de detección y después a través de la segunda zona de detección. En la primera zona de detección, se captura el ligando diana. Cualquier enzima de la muestra escinde el marcador del ligando diana y el marcador escindido se captura en la segunda zona de detección, dejando cualquier marcador restante no escindido unido al ligando diana en la primera zona de detección. Por consiguiente, la presencia de la enzima en la muestra se determina mediante la presencia del marcador en la segunda zona de detección (o la ausencia del marcador de la primera zona de detección).

20 25 30 35 Un problema con el kit divulgado en el documento US2006/0003394 es que el kit puede tender a dar resultados inexactos debido a que la enzima continúa siendo activa mientras la mezcla fluye a lo largo del medio cromatográfico. La enzima escinde a continuación el marcador del ligando diana mientras que los complejos reactivos están inmovilizados en la primera zona de captura. Por lo tanto, la señal en la primera zona de detección y en la segunda zona de detección puede tender a variar a lo largo del tiempo, no siendo claro el punto final de la reacción.

40 Otro problema del kit divulgado en el documento US2006/0003394 es que sólo puede detectar una enzima que escinde el ligando diana y no es capaz de detectar enzimas que tengan otros efectos, tales como restos de adición a un ligando diana (por ej., fosforilación o glucosilación).

45 Otro problema del kit divulgado en el documento US2006/0003394 es que no puede detectar la actividad de enzimas que tienen que escindir el extremo terminal del ligando diana, tal como una exopeptidasa, o una exocarbohidrasa, debido a que el requisito de unión de un marcador al extremo terminal cambiaría la naturaleza química del extremo terminal en un grado que evitaría la interacción con el sitio activo de la enzima.

La presente invención busca aliviar uno o más de los problemas anteriores.

50 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo de detección de enzimas para la detección de la presencia en una muestra de una enzima capaz de modificar un sustrato proporcionado que comprende:

- (i) un medio cromatográfico o un soporte sólido
- (ii) un sustrato que comprende una región de unión y una región de modificación sensible a la modificación por la enzima de un estado no modificado a un estado modificado;
- 55 (iii) una primera molécula de reconocimiento de la captura inmovilizada sobre o en el medio cromatográfico o en el soporte sólido capaz de unir la región de unión del sustrato;
- (iv) una molécula de reconocimiento del sustrato capaz de unir específicamente la región de modificación en el estado no modificado, siendo el sitio de unión de la molécula de reconocimiento del sustrato, de tal forma que la región de modificación del sustrato se une preferencialmente a dicha molécula de reconocimiento del sustrato, comparado con la enzima cuando está mezclada y
- 60 (v) un indicador detectable unido a la molécula de reconocimiento del sustrato.

Ventajosamente, la afinidad de la molécula de reconocimiento del sustrato por el sustrato comprende una tasa de disociación relativamente baja (k_d).

65 Preferiblemente, la afinidad de la molécula de reconocimiento del sustrato por el sustrato comprende una tasa de

disociación relativamente baja (k_d) y una tasa de asociación relativamente alta (k_a).

Preferiblemente, la tasa de disociación (k_d) de la molécula de reconocimiento del sustrato está entre $10^{-4} \cdot s^{-1}$ y $10^{-7} \cdot s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^{-5} \cdot s^{-1}$ y $10^{-6} \cdot s^{-1}$.

5 Preferiblemente, la tasa de asociación (k_a) de la molécula de reconocimiento del sustrato está entre $10^{-5} \cdot s^{-1}$ y $10^{-9} \cdot s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^7 \cdot s^{-1}$ y $10^8 \cdot s^{-1}$.

10 Ventajosamente, la molécula de reconocimiento del sustrato tiene una tasa de disociación (k_d) más baja y una tasa de asociación (k_a) más alta por el sustrato que la enzima tiene por el sustrato.

Preferiblemente, el medio cromatográfico comprende además una segunda molécula de reconocimiento de la captura, inmovilizada sobre o en el medio cromatográfico y capaz de unir la molécula de reconocimiento del sustrato, opcionalmente en combinación con un fragmento del sustrato.

15 Ventajosamente, la primera molécula de reconocimiento del sustrato y la región de unión y/o la segunda molécula de reconocimiento de la captura y la molécula de reconocimiento del sustrato son cada una de ellas dos mitades de un par, en el que el par de unión es: un antígeno y un fragmento de unión al anticuerpo o al antígeno específico del mismo; biotina y avidina, estreptavidina, neutravidina o captavidina; proteína A y G; un carbohidrato y una lectina; dos secuencias de nucleótidos complementarias; una molécula efectora y una receptora; una hormona y una proteína de unión a hormonas; un cofactor enzimático y una enzima; un inhibidor enzimático y una enzima; un dominio de unión a celulosa y fibras de celulosa; ácido aminofenilborónico inmovilizado y moléculas portadoras cis-diol; xiloglucano y fibras de celulosa y análogos, derivados y fragmentos de los mismos.

25 Convenientemente, la molécula de reconocimiento del sustrato es un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno; una lectina; una secuencia de nucleótidos; una molécula de receptor; o una proteína de unión a hormona capaz de unir la región de modificación en estado modificado o en estado no modificado.

30 Alternativamente, la molécula de reconocimiento del sustrato es avidina, estreptavidina, neutravidina, o captavidina capaz de unir biotina no modificada.

Preferiblemente, la enzima es una hidrolasa, preferiblemente una peptidasa, lipasa, nucleasa, carbohidrasa, fosfatasa, sulfatasa, neuraminidasa, esterasa, ADNasa o ARNasa.

35 Alternativamente, la enzima es una quinasa, una glucosiltransferasa, una oxidasa, una reductasa o una transaminasa.

Convenientemente, el indicador detectable está covalentemente unido a la molécula de reconocimiento del sustrato.

40 Preferiblemente, el indicador detectable es un fluoróforo, una partícula de oro, un cromógeno, un compuesto luminiscente; un compuesto radiactivo; un compuesto visible, un liposoma u otra vesícula que contiene sustancias productoras de señales, una especie electroactiva o una combinación de una enzima y su sustrato.

45 Ventajosamente, el dispositivo de detección de enzimas comprende un primer y segundo sustratos, comprendiendo cada uno de ellos una región de modificación, siendo la región de modificación del primer sustrato sensible a la modificación por una primera enzima, siendo la región de modificación del segundo sustrato sensible a la modificación por una segunda enzima.

50 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de detección de una enzima capaz de modificar un sustrato que comprende los pasos de:

- (i) proporcionar un sustrato que comprende una región de unión y una región de modificación sensible a la modificación por la enzima de un estado no modificado a un estado modificado, proporcionando un soporte sólido y uniendo la región de unión del sustrato al soporte sólido, proporcionando una primera molécula de reconocimiento de la captura, capaz de unir la región de unión sobre el soporte sólido;
- (ii) proporcionar una muestra sospechosa de contener una enzima;
- (iii) proporcionar una molécula de reconocimiento del sustrato a la cual se acopla un indicador detectable, en la que la molécula de reconocimiento del sustrato une específicamente la región de modificación en el estado no modificado, siendo el sitio de unión de la molécula de reconocimiento del sustrato, de tal forma que la región de modificación del sustrato se une preferencialmente a dicha molécula de reconocimiento del sustrato, comparado con la enzima cuando está mezclada;
- (iv) mezclar la muestra y el sustrato, de tal forma que al menos parte de la enzima de la muestra modifique el sustrato;
- (v) poner en contacto el sustrato y la molécula de reconocimiento del sustrato y detectar la presencia del indicador; o

- (i) proporcionar un sustrato que comprende una región de unión y una región de modificación sensible a la modificación por la enzima de un estado no modificado a un estado modificado;
- (ii) proporcionar una muestra sospechosa de contener una enzima;
- 5 (iii) proporcionar una molécula de reconocimiento del sustrato a la cual se acopla un indicador detectable, en la que la molécula de reconocimiento del sustrato une específicamente la región de modificación en el estado no modificado, siendo el sitio de unión de la molécula de reconocimiento del sustrato, de tal forma que la región de modificación del sustrato se une preferencialmente a dicha molécula de reconocimiento del sustrato, comparado con la enzima cuando está mezclada;
- 10 (iv) mezclar la muestra y el sustrato, de tal forma que al menos parte de la enzima de la muestra modifique el sustrato;
- (v) depositar el sustrato y la molécula de reconocimiento del sustrato sobre o en un medio cromatográfico, en el que el medio cromatográfico comprende una primera molécula de reconocimiento de la captura inmovilizada sobre o en el medio cromatográfico, siendo la primera molécula de reconocimiento del sustrato capaz de unir la región de unión, poner en contacto el sustrato y la molécula de reconocimiento del sustrato y detectar la presencia del indicador.
- 15

Ventajosamente, la afinidad de la molécula de reconocimiento del sustrato por el sustrato comprende una tasa de disociación relativamente baja (k_d).

- 20 Preferiblemente, la afinidad de la molécula de reconocimiento del sustrato por el sustrato comprende una tasa de disociación relativamente baja (k_d) y una tasa de asociación relativamente alta (k_a).

Preferiblemente, la tasa de disociación (k_d) de la molécula de reconocimiento del sustrato está entre $10^{-4} \cdot s^{-1}$ y $10^{-7} \cdot s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^{-5} \cdot s^{-1}$ y $10^{-6} \cdot s^{-1}$.

- 25 Preferiblemente, la tasa de asociación (k_a) de la molécula de reconocimiento del sustrato está entre $10^{-5} \cdot s^{-1}$ y $10^{-9} \cdot s^{-1}$, más preferiblemente entre $10^7 \cdot s^{-1}$ y $10^8 \cdot s^{-1}$.

- 30 Ventajosamente, la molécula de reconocimiento del sustrato tiene una tasa de disociación (k_d) más baja y una tasa de asociación (k_a) más alta para el sustrato que la enzima tiene por el sustrato.

- 35 Preferiblemente, el medio cromatográfico comprende además una segunda molécula de reconocimiento de la captura, inmovilizada sobre o en el medio cromatográfico, siendo la segunda molécula de reconocimiento de la captura capaz de unirse a la molécula de reconocimiento del sustrato, opcionalmente en combinación con un fragmento del sustrato, en el que el procedimiento comprende además el paso de detectar la presencia de la molécula de reconocimiento del sustrato en la segunda molécula de reconocimiento de la captura.

- 40 Ventajosamente, la primera molécula de reconocimiento del sustrato y la región de unión y/o la segunda molécula de reconocimiento de la captura y la molécula de reconocimiento del sustrato son dos mitades de un par de unión, en el que el par de unión es un antígeno y un fragmento de unión al anticuerpo o al antígeno del mismo; biotina y avidina, estreptavidina, neutravidina o captavidina; una inmunoglobulina (o un dominio adecuado de la misma) y proteína A y G; un carbohidrato y una lectina; dos secuencias de nucleótidos complementarias; una molécula efectora y una receptora; una hormona y una proteína de unión a hormonas; un cofactor enzimático y una enzima; un inhibidor enzimático y una enzima; un dominio de unión a celulosa y fibras de celulosa; ácido aminofenilborónico inmovilizado y moléculas portadoras cis-diol o xiloglucano y fibras de celulosa y análogos, derivados y fragmentos de los mismos.
- 45

Convenientemente, la molécula de reconocimiento del sustrato es un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno; una lectina; una secuencia de nucleótidos; una molécula de receptor; o una proteína de unión a hormona capaz de unir la región de modificación en estado modificado o en estado no modificado.

- 50 Alternativamente, la molécula de reconocimiento del sustrato es avidina, estreptavidina, neutravidina, o captavidina capaz de unir biotina no modificada.

- 55 Preferiblemente, la enzima es una hidrolasa, preferiblemente una peptidasa, lipasa, nucleasa, homooligosacaridasa o heterooligosacaridasa, homopolisacaridasa o heteropolisacaridasa, carbohidrasa, fosfatasa, sulfatasa, neuraminidasa, esterasa, ADNasa o ARNasa.

Alternativamente, la enzima es una quinasa, una glucosiltransferasa, una oxidasa, una reductasa o una transaminasa.

- 60 Convenientemente, el indicador está covalentemente unido a la molécula de reconocimiento del sustrato.

- 65 Preferiblemente, el indicador detectable es un fluoróforo, una partícula de oro, un cromógeno, un compuesto luminiscente; un compuesto radiactivo; un compuesto visible, un liposoma u otra vesícula que contiene sustancias productoras de señales, una especie electroactiva o una combinación de una enzima y su sustrato.

Ventajosamente, el paso (i) comprende proporcionar un primer y segundo sustratos, comprendiendo cada uno de ellos una región de modificación, siendo la región de modificación del primer sustrato sensible a una primera enzima, siendo la región de modificación del segundo sustrato sensible a la modificación por una segunda enzima y en el que el paso (v) comprende detectar la interacción entre el primero y segundo sustratos y la molécula de reconocimiento del sustrato.

Convenientemente, el paso (iii) comprende proporcionar una primera y segunda moléculas de reconocimiento del sustrato, uniendo cada uno de ellos específicamente la región de modificación del primero y segundo sustratos, respectivamente, tanto en el estado modificado como no modificado, siendo el sitio del unión de la primera y segunda moléculas de reconocimiento del sustrato de tal forma que la región de modificación del primer sustrato se une preferencialmente (o competitivamente) a dicha primera molécula de reconocimiento del sustrato, comparado con la primera enzima y la región de modificación del segundo sustrato se une preferencialmente (o competitivamente) a dicha segunda molécula de reconocimiento del sustrato, comparado con la segunda enzima y en el que el paso (v) comprende detectar la interacción entre el primero y segundo sustratos y la primera y segunda moléculas de reconocimiento del sustrato.

Por lo tanto, aspectos de la invención proporcionan un sistema de detección de enzimas para detectar la presencia, en una muestra, de una enzima capaz de modificar un sustrato proporcionado, el cual tiene una región de modificación que es sensible a la modificación por la enzima de un estado no modificado a un estado modificado. El dispositivo transforma la actividad enzimática en un ensayo de unión de afinidad, en el que la presencia de la actividad enzimática se expresa como indicador unido, tal como la intensidad relativa de una línea de señal. En este procedimiento, se detecta el sustrato no modificado y se une a una molécula de reconocimiento del sustrato que está unida a una región de modificación del sustrato en el estado no modificado. Durante el uso, el sustrato se une preferencialmente (o competitivamente) a la molécula de reconocimiento del sustrato en comparación con la molécula de la enzima cuando está mezclada. Esto se debe a que la molécula de reconocimiento del sustrato tiene una tasa de disociación (k_d) menor que la de la enzima. Generalmente, las enzimas tienen una tasa de disociación (k_d) elevada, de modo que el producto deja el sitio activo de la enzima rápidamente para que el recambio sea elevado. La molécula de reconocimiento del sustrato tiene también una tasa de asociación (k_a) elevada por el sustrato que le permite además unir preferencialmente la enzima al sustrato. Dichas tasas de disociación y asociación se miden usando tecnología, tal como Biacore. La afinidad de la molécula de reconocimiento del sustrato por la enzima es mensurablemente superior a la afinidad de la enzima por el sustrato, es decir, en presencia tanto de la molécula de reconocimiento del sustrato como de la enzima no existe una disminución apreciable de la cantidad de sustrato presente en la mezcla. El dispositivo comprende además un indicador detectable acoplado a la molécula de reconocimiento del sustrato.

La molécula de reconocimiento del sustrato de la presente invención secuestra la región modificable del sustrato, y al hacerlo así, evita que la enzima modifique más el sustrato. Esta característica es ventajosa para usar en ensayos de punto final (por ej., ensayos cinéticos). Permite que el procedimiento de ensayo se pueda controlar estrechamente porque la actividad catalítica de la enzima se puede detener precisamente después de un período predeterminado de tiempo. Esto evita un proceso variable e incontrolado de la actividad de transformación del sustrato, es decir, el secuestro de la región de modificación del sustrato por la molécula de reconocimiento del sustrato controla y define con exactitud el punto final del ensayo.

Con el fin de que la presente invención se comprenda totalmente y se puedan apreciar las características de la misma, se describirán a continuación realizaciones de la invención mediante ejemplos, haciendo referencia a las figuras acompañantes, en las cuales:

La Figura 1 es una vista esquemática de un componente de un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con una realización de la presente invención;

La Figura 2 es un diagrama de la acción de otro componente de un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con una realización de la presente invención;

La Figura 3 es una vista esquemática de otro componente de un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con una realización de la presente invención;

La Figura 4 es una vista esquemática de un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con una realización de la presente invención, en uso y

La Figura 5 es una vista esquemática de un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con una realización de la presente invención, en uso.

Con respecto a la Figura, 1, se muestra una vista transversal esquemática de algunos componentes de un dispositivo de detección de enzimas 1 para la detección de una enzima analito. El dispositivo de detección de enzimas 1 comprende una tira reactiva 2 de nitrocelulosa que forma un medio cromatográfico. La tira reactiva 2 tiene unos extremos superior e inferior, 3, 4. Adyacente al extremo superior 3 de la tira de ensayo 2 se proporciona una

zona de recepción de la muestra 5 que comprende una almohadilla absorbente. Además hacia el extremo inferior 4 de la tira de ensayo 2 se proporciona una pluralidad de las primeras moléculas de reconocimiento de la captura 6 inmovilizadas sobre la superficie de la tira de ensayo 2. Las primeras moléculas de reconocimiento de la captura forman una primera zona de detección 7. Además, hacia el extremo inferior 4 de la tira de ensayo 2, desde la primera zona de detección 7, se proporciona una pluralidad de las segundas moléculas de reconocimiento de la captura 8 inmovilizadas sobre la superficie de la tira de ensayo 2. Las segundas moléculas de reconocimiento de la captura 8 forman una segunda zona de detección 9.

Ahora con respecto a la Figura 2, se describirá otro componente del dispositivo de detección de enzimas, concretamente un sustrato 10. El sustrato 10 comprende un ligando no modificable 11 conectado con una segunda región 12. El ligando no modificable 11 es capaz de ser reconocido y capturado por las primeras moléculas de reconocimiento de la captura 6 de la primera zona de detección 7. Es decir, el ligando no modificable 11 forma una mitad de un par de unión, siendo la otra mitad del par de unión una de las primeras moléculas de reconocimiento de la captura 6. La segunda región 12 comprende un segundo ligando (conocido como la "región de modificación") 14 el cual está conectado al ligando no modificable 11 mediante una estructura 13 de núcleo interior (espaciador) opcional. El segundo ligando 14 es modificable por la enzima analito. Como se muestra en la Figura 2, la enzima analito es una proteasa que modifica el segundo ligando 14 escindiendo una parte de la estructura, para liberar un fragmento 15. Sin embargo, en otras realizaciones, una modificación diferente de la región de modificación 14 (es decir, el segundo ligando) se hace mediante la enzima, por ejemplo, la adición de un grupo fosfato. Otras modificaciones ilustrativas incluyen glucosiltransferasas que transfieren un grupo azúcar desde una molécula donante hasta un sitio receptor, oxidasas que oxidan un sitio diana, reductasas que reducen un sitio diana y transaminasas que transfieren grupos amino entre aminoácidos y cetoácidos. Con respecto a la Figura 3, se describirá ahora otro componente de la enzima de detección. Un miembro de unión 16 comprende una molécula de reconocimiento del sustrato 17 que es capaz de unirse específicamente a la región de modificación 14 del sustrato 10. Además, la molécula de reconocimiento del sustrato 17 se une al sustrato 10 en la región (la región de modificación 14) que está unida y es modificada por la enzima que se quiere detectar. Es decir, la región de modificación 14 del sustrato se une preferencialmente (o competitivamente) a la molécula de reconocimiento del sustrato 17 en comparación con la enzima si la enzima y la molécula de reconocimiento del sustrato están mezcladas con la región de modificación 14. Además, la molécula de reconocimiento del sustrato 17 puede tener una mayor afinidad por la región de modificación 14 que la enzima. Por consiguiente, una vez que la región de modificación 14 se ha unido a la molécula de reconocimiento del sustrato 17, la enzima es incapaz de unirse a la región de modificación 14 y, por consiguiente, no puede catalizar la modificación de la región de modificación 14.

Acoplado a la molécula de reconocimiento del sustrato 17 existe un indicador o marcador 18 detectable, que es, por ejemplo, un fluoróforo.

El uso del dispositivo de detección de enzimas 1 de acuerdo con esta realización se describirá ahora con referencia a la Figura 4. En este ejemplo, se proporciona una muestra que no contiene la enzima. La muestra se mezcla con el sustrato 10 en condiciones que permitirían a cualquier enzima de la muestra modificar la región de modificación 14. Como se ha señalado previamente, en este ejemplo particular, la muestra no contiene la enzima y, por consiguiente, no se produce modificación de la región de modificación 14. La mezcla de la muestra y el sustrato 10 se ponen a continuación en contacto con el miembro de unión 16 en condiciones que permiten al miembro de unión 16 unir el sustrato 10. La mezcla de la muestra, sustrato 10 y miembro de unión 16 se deposita a continuación en la zona de recepción de la muestra 5 en la tira reactiva 2. Debido a la naturaleza cromatográfica de la tira de ensayo 2, la mezcla fluye a lo largo y/o a través de la tira de ensayo 2 junto con un recorrido del flujo líquido desde el extremo superior 3 de la tira de ensayo 2 hasta el extremo inferior 4 de la tira de ensayo 2; es decir, en la dirección de la flecha 19.

La mezcla entra en contacto con la primera zona de detección 7 y el ligando no modificable 11 de cada sustrato 10 se une a una molécula de reconocimiento de la captura 6 de la primera zona de detección 7. Por lo tanto, el sustrato 10 se queda inmovilizado en la primera zona de detección 7. Además, dado que el miembro de unión 16 se une al sustrato 10, el miembro de unión 16 también se queda inmovilizado en la primera zona de detección 7. Aunque otros componentes de la mezcla continúan fluyendo en la dirección de la flecha 18 a lo largo de la tira de ensayo 2, existe poco o nada del miembro de unión 16 para unirse en la segunda zona de detección 9. Por consiguiente, la ausencia de la enzima de la muestra está indicada por la presencia del marcador 18 en la primera zona de detección 7 y la ausencia del marcador 18 de la segunda zona de detección 9.

Ahora con respecto a la Figura 5, se describirá un dispositivo de detección de enzimas 1 de acuerdo con esta realización de la presente invención en uso, detectando la presencia de la enzima en una muestra. El sustrato 10 se mezcla con la muestra en condiciones, tales que la enzima es capaz de modificar la región de modificación 14 del sustrato 10. En esta realización, la enzima escinde la región de modificación 14 para liberar el fragmento 15. Después de un período predeterminado de tiempo, la mezcla del sustrato 10 y la enzima se ponen en contacto con el miembro de unión 16 en condiciones, tales que el miembro de unión 16 se une a cualquier parte de la región de modificación 14 no modificada. Al hacerlo así, el miembro de unión 16 bloquea la enzima desde la región de modificación 14, llevando un extremo hasta la actividad catalítica de la enzima. Más específicamente, en esta realización el sustrato 10 deja de ser escindido por la enzima.

La mezcla 20 se deposita a continuación en la zona de recepción de la muestra 5 y fluye a lo largo o a través de la tira de ensayo 2 en la dirección de la flecha 19. La muestra 20 entra por primera vez en contacto con la primera zona de detección 7 en donde el ligando no modificable 11 de cada sustrato 10 se une a la primera molécula de reconocimiento de la captura. Por lo tanto, el sustrato 10 modificado y no modificado se inmoviliza en la primera zona de detección 7. Además, los miembros de unión 16 no son capaces de unir el sustrato 10, porque la región de modificación 14 se ha escindido con la pérdida del fragmento 15. Los miembros de unión 16 son específicos de la región de modificación no modificada (es decir "intacta" en esta realización) y no puede unirse al ligando 14 incompleto. Por consiguiente, el resto de la muestra 20 continúa fluyendo a lo largo de la tira de ensayo 2 en la dirección de la flecha 19 hasta que entra en contacto con la segunda zona de detección 9 en la que las moléculas de reconocimiento del sustrato 16 están unidas e inmovilizadas por las segundas moléculas de reconocimiento de la captura 8. Por lo tanto, los miembros de unión 16, incluidos los marcadores 18, están inmovilizados en la segunda zona de detección 9. Por consiguiente, la presencia de la enzima en la muestra está indicada por la presencia del marcador 18 inmovilizado en la segunda zona de detección 9 y la ausencia del marcador 18 de la primera zona de detección 7.

También hay que señalar que no es esencial para la invención que la modificación de la región de modificación 14 sea un sitio de escisión de la misma. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enzima que se va a detectar modifica la región de modificación 14 mediante la adición de un resto a la región de modificación 14. La presencia de la enzima en la muestra sigue teniendo como resultado que el miembro de unión 16 quede inmovilizado en la segunda zona de detección 9 en lugar de en la primera zona de detección 7 pero con la diferencia de que no se liberan fragmentos 15. En su lugar, el sustrato 10 sigue intacto, pero el miembro de unión 16 es incapaz de unir la región de modificación en su estado modificado y, por consiguiente, fluye a través de la primera zona de detección 7 hasta la segunda zona de detección 9 donde se une.

Además, también se divulga en la presente invención un dispositivo y un procedimiento en el que el miembro de unión 16 es específico de la región de modificación en su estado modificado. Por ejemplo, en una realización en la cual la enzima modifica una región de modificación 14 añadiendo un resto a la misma, el miembro de unión 16 une la región de modificación 14 cuando el resto está presente pero no cuando está ausente. Por lo tanto, el miembro de unión 16 está inmovilizado en la segunda zona de detección 9 si la enzima está ausente de la muestra y en la primera zona de detección 7 si la enzima está presente en la muestra. Por consiguiente, la presencia de la enzima en una muestra está indicada por la presencia del marcador 18 inmovilizado en la primera zona de detección 7 y la ausencia del marcador 18 de la segunda zona de detección 9.

En algunas realizaciones, se evalúa la concentración relativa del marcador 18 en la primera y segunda zonas de detección 7, 9 para indicar la concentración relativa de la enzima en la muestra. Por ejemplo, en las realizaciones donde el marcador 18 es un indicador visible, tal como una partícula de oro, se compara la intensidad relativa del indicador entre la primera y segunda zonas de detección 7, 9.

En realizaciones de la presente invención, la enzima que se va a detectar puede ser una hidrolasa. Por ejemplo, la enzima puede ser una proteasa, una peptidasa, lipasa, nucleasa, homooligosacaridasa o heterooligosacaridasa, homopolisacaridasa o heteropolisacaridasa, carbohidrasa, fosfatasa, sulfatasa, neuraminidasa (por ej., una sialidasa), esterasa, ADNasa o ARNasa. En otras realizaciones, la enzima modifica la región de modificación de otra forma distinta a la escisión de la misma. Por ejemplo, la enzima puede ser una quinasa, glucosiltransferasa, una reductasa o transaminasa.

La región de modificación 14, debe ser, por supuesto, adecuada para la enzima que se va a detectar. Es decir, si la enzima es una proteasa, entonces la región de modificación 14 debe ser un péptido que escinde la enzima. En otro ejemplo, si la enzima es una sialidasa, entonces la región de modificación 14 puede comprender un antígeno Lewis de silalilo. Otra región de modificaciones incluye ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, ésteres y glucoproteínas. En el caso de que la enzima sea una glucosiltransferasa, se transfiere un grupo azúcar desde una molécula donadora hasta un sitio de receptor. Cuando la enzima es una oxidasa, se oxida un sitio diana (por ej., la glucosa se oxida en ácido glucónico). Si la enzima es una reductasa, esta reduce un sitio diana (por ej., la quinina reductasa reduce las quinonas en fenoles). Las transaminasas transfieren grupos aminoácidos entre aminoácidos y cetoácidos.

Las moléculas de reconocimiento de la captura 6 y los ligandos no modificables 11 pueden ser cualquier componente adecuado de un par de unión específico. Por ejemplo, estos pueden ser: un antígeno y un fragmento de unión al anticuerpo o al antígeno del mismo; biotina y avidina, estreptavidina, neutravidina o captavidina; una inmunoglobulina (o dominio de unión adecuado del mismo) y proteína A y G; un carbohidrato y una lectina; dos secuencias de nucleótidos complementarias; una molécula efectora y una receptora; una hormona y una proteína de unión a hormonas; un cofactor enzimático y una enzima; un inhibidor enzimático y una enzima; un dominio de unión a celulosa y fibras de celulosa; ácido aminofenilborónico inmovilizado y moléculas portadoras cis-diol; xiloglucano y fibras de celulosa y análogos, derivados y fragmentos de los mismos.

Se prefiere particularmente que el ligando no modificable 11 sea un resto biotina y la primera molécula de reconocimiento de la captura sea un resto estreptavidina, inmovilizado sobre la superficie de la tira de ensayo 2.

La molécula de reconocimiento del sustrato 17 es preferiblemente un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que es específico de la región de modificación 14. Dichos anticuerpos se crean de tal modo que el resultado del ensayo de unión, es decir, la k_d y la k_a sean óptimos para el ensayo deseado, por ej., una tasa de asociación alta y una tasa de disociación baja. Esto se hace mediante técnicas de inmunización familiares para los expertos en la materia. Los anticuerpos de alta afinidad se producen administrando repetidamente concentraciones decrecientes de antígeno al animal. Generalmente, se utilizan cabras y ovejas para producir anticuerpos de alta afinidad.

En otras realizaciones, la molécula de reconocimiento del sustrato 17 es una lectina; una secuencia de nucleótidos; una molécula de receptor o una proteína de unión a hormonas capaz de unir la región de modificación tanto en el estado modificado como en el estado no modificado. Alternativamente, se puede usar cualquier par de moléculas de unión específicas descritas anteriormente, siempre que la molécula de reconocimiento del sustrato 17 reconozca un ligando diana adecuado que se puede incorporar en el sustrato 10 y que siga siendo modificado por la enzima analito, de tal forma que cambie la capacidad de la molécula de reconocimiento del sustrato 17 para interaccionar con la región de modificación 14. Por ejemplo, en las realizaciones en donde la región de modificación comprende biotina, la molécula de reconocimiento del sustrato puede ser avidina, estreptavidina, neutravidina o captavidina capaz de unir biotina no modificada, pero no es capaz de unir biotina que se haya modificado por la acción de la enzima que se va a detectar. Se prefiere particularmente que las moléculas de reconocimiento del sustrato 17 sean anticuerpos de oveja y las segundas moléculas de reconocimiento de la captura 8 sean anticuerpos anti-oveja.

En algunas realizaciones de la presente invención, el miembro de unión 16 está seco en la estructura de la tira de ensayo 2, en la zona de recepción de la muestra 5 o entre la zona de recepción de la muestra 5 y la primera zona de detección 7. En estas realizaciones, la muestra se mezcla con un sustrato 10 en condiciones que permitan a la enzima modificar la región de modificación 14 del sustrato 10. La mezcla se aplica a continuación a la zona de recepción de la muestra 5 y se pone en contacto con el miembro de unión 16 sobre la superficie de la tira de ensayo 2. Es decir, no existe mezcla de la muestra con el miembro de unión 16 antes de depositar la muestra sobre la tira de ensayo 2.

En algunas realizaciones, se proporciona una barrera soluble sobre la tira de ensayo 2, justo hacia la parte inferior de la zona de recepción de la muestra 5. La barrera soluble es impermeable a la mezcla de la muestra y sustrato durante un período de tiempo predeterminado, después de que la barrera se rompa y la mezcla siga fluyendo a lo largo de la tira de ensayo. Se prefiere particularmente combinar esta característica con la característica de que el miembro de unión 16 está seco en la tira de ensayo 2 justo hacia la parte inferior de la barrera soluble. En dicha realización, se proporciona la muestra y sustrato con el tiempo suficiente para que se mezcle y para que cualquier enzima modifique la región de modificación 14 antes de que la muestra disuelva la barrera soluble y entre en contacto con el miembro de unión 16 que une la región de modificación 14 y evite que la enzima catalice cualquier reacción posterior en la región de modificación 14. La tira de ensayo 2 funciona a continuación como se ha descrito anteriormente. La barrera soluble puede ser, por ejemplo, de PVA, PVA de peso molecular (PM) particularmente bajo o gelatina soluble en agua fría.

El marcador 18 en cualquier reivindicación puede ser cualquier sustancia que sea capaz de generar directamente o indirectamente una señal detectable. Un marcador adecuado es un cromógeno, compuesto luminiscente (por ej., fluorescente o fosforescente); compuesto radiactivo; compuesto visible (por ej., látex o una partícula metálica, tal como oro), liposoma u otra vesícula que contiene sustancias productoras de señal; una especie electroactiva o una combinación de una enzima y su sustrato. Un marcador preferido es partículas de oro que se acumulan para formar una zona visible a simple vista en la primera y/o segunda zona de detección 7, 9 (ver Figura 1). También hay que señalar que en algunas realizaciones de la presente invención, la molécula de reconocimiento del sustrato 17 no está permanentemente unida al marcador 18, pero que sin embargo se puede acoplar a través de un par de unión específico como se ha descrito anteriormente.

En determinadas realizaciones, el dispositivo de detección de enzimas 1 comprende dos sustratos 10 diferentes, teniendo cada uno de ellos una región de modificación 14 sensible a la modificación por una enzima diferente. En algunas realizaciones, ambos sustratos 10 son, por lo demás, idénticos de modo que la tira de ensayo 2 proporciona la misma señal independientemente de cuál sea la enzima presente en la muestra. En otras realizaciones, se proporcionan el primero y segundo miembros de unión 16, siendo cada uno de ellos específicos de la región de modificación 14 de uno de los sustratos 10 pero no del otro. La región de modificación 14 de un sustrato se une preferencialmente (o competitivamente) al primer miembro de unión 16 en comparación con una enzima, mientras que la región de modificación 14 del otro sustrato se une preferencialmente (o competitivamente) al segundo miembro de unión 16 en comparación con la otra enzima. Además, el marcador 18 del primer miembro de unión 16 proporciona una señal diferente a la del marcador 18 del segundo miembro de unión 16. Por lo tanto, la presencia de cada enzima se puede distinguir por la presencia de cada señal. En otra realización, el primero y segundo miembros de unión se proporcionan de modo similar al de la realización previa, con la diferencia de que ambos miembros de unión portan el mismo marcador 18 y la segunda zona de detección está suplementada con una tercera zona de detección. La segunda y terceras zonas de detección tienen una segunda y tercera moléculas de reconocimiento de la captura, respectivamente. La segunda y tercera moléculas de reconocimiento de la captura son específicas del primer y segundo miembros de unión respectivamente. Por lo tanto, la presencia de cada una de

las enzimas es distinguible por la presencia o ausencia del marcador 18 en cada una de la segunda y tercera zonas de captura.

5 En algunas variantes de las realizaciones donde se proporcionan el primero y segundo miembros de unión 16, el dispositivo de detección de enzimas 1 comprende una única zona de recepción de la muestra 5 que está en comunicación fluida con la primera y segunda tiras de ensayo (dispuestas, por ejemplo, en paralelo entre sí o en forma radial hacia el exterior desde la zona de recepción de la muestra 5). La primera tira de ensayo tiene una primera zona de detección 7 que une el primer sustrato y una segunda zona de detección 9 que une el miembro de unión 16 que es específico del primer sustrato. De modo similar, la segunda tira de ensayo tiene una primera zona de detección 7 que une el segundo sustrato y una segunda zona de detección 9 que une el miembro de unión 16 que es específico del segundo sustrato. De esta forma, la primera y segunda tiras de ensayo proporcionan individualmente resultados que indican la presencia o ausencia de la primera y segunda enzimas en una muestra.

15 En las realizaciones específicas descritas anteriormente, el dispositivo comprende un medio cromatográfico en forma de la tira de ensayo 2. Sin embargo, en realizaciones alternativas no se proporciona un medio cromatográfico. Por ejemplo, en una realización, las primeras moléculas de reconocimiento de la captura 6 están inmovilizadas en un soporte sólido, tal como una columna o perlas. La muestra se mezcla con el sustrato 10 y seguidamente con los miembros de unión 16 como en las realizaciones descritas previamente. La mezcla de la muestra, el sustrato 10 y el miembro de unión 16 se lavan a continuación del soporte, permitiendo que miembros de unión 11 específicos unan las moléculas de reconocimiento de la captura 6. Todo material no unido se elimina o se deja drenar. Si la enzima está presente en la muestra, entonces la región de modificación 14 se escinde y el miembro de unión 16 es incapaz de unir el sustrato 10 y, por lo tanto, el marcador 18 no queda inmovilizado sobre el soporte sólido. Por consiguiente, la presencia de la enzima en la muestra se indica por la ausencia del marcador en el soporte sólido. Si la enzima no está presente en la muestra, entonces el miembro de unión 16 une el sustrato 10 y, por lo tanto, inmoviliza el marcador 18 sobre el soporte sólido. En consecuencia, la ausencia de la enzima de la muestra se indica por la presencia del marcador 18 inmovilizado en el soporte sólido.

20 En algunas realizaciones, este tipo de procedimiento se lleva a cabo en placas de microvaloración de 96 pocillos siguiendo un procedimiento bien conocido por los expertos en la materia. Alternativamente, el procedimiento se puede llevar a cabo en sistemas robotizados utilizando diversos materiales de captura en fase sólida con sistemas de micromatriz.

Ejemplo 1

35 Un kit que comprende los siguientes componentes:

- 1) Un hisopo sobre un vástago para la recogida de un líquido de muestra (por ej., de una herida).
- 40 2) Una tira de ensayo de flujo lateral, la cual está montada en una caja de plástico. La tira de ensayo tiene una primera zona de detección, la cual comprende estreptavidina adsorbida como una primera línea de ensayo a lo largo del recorrido del flujo de la tira de ensayo y una segunda zona de detección que comprende anticuerpos anti-oveja adsorbidos como una segunda línea de ensayo a lo largo del recorrido del flujo de la tira de ensayo, en dirección descendente desde la primera línea de ensayo. Existe una ventana de observación en la caja de plástico a través de la cual se visualizan la primera y segunda líneas de ensayo. También existe una almohadilla de recepción de la muestra integrada, en dirección ascendente desde la primera línea de ensayo. Además, la tira de ensayo tiene partículas de oro que portan anticuerpos de oveja (moléculas de reconocimiento del sustrato) secas en la primera tira de ensayo entre la almohadilla de recepción de la muestra y la primera línea de ensayo o secas en la propia almohadilla de recepción de la muestra.
- 50 3) Un tubo de ensayo, en el cual se puede colocar el hisopo junto con el tampón de extracción de la muestra y el sustrato. El tubo de ensayo posee un pico abatible, que se cierra ajustándose cuando la mezcla muestra/líquido de extracción/sustrato está lista para dispensarse en la tira de ensayo. La muestra puede aplicarse gota a gota desde el tubo invertido a través del pico.
- 55 4) Líquido de extracción que consiste en solución salina con tampón fosfato (PBS) a pH 7,2 y Tween™ 20 al 0,1%.
- 60 5) Un sustrato (que puede estar ya disuelto en el líquido de extracción). El sustrato consiste en un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos dirigida a MMP-9. La secuencia (G)PQGIFG(Q) es especialmente adecuada, aunque existen otras muchas que se pueden extraer de la literatura científica. El sustrato lleva un grupo de biotina terminal, conectado a través de un espaciador/enlazador de polietilenglicol. El péptido es reconocido por los anticuerpos de oveja a los cuales se unen partículas de oro.

El procedimiento para uso del kit como se indica a continuación:

65

ES 2 390 995 T3

5 PASO 1: Se recoge una muestra de líquido (la muestra de ensayo) mediante el hisopo suministrado con el kit. El hisopo, que lleva la muestra de líquido, se coloca en el tubo de ensayo con el tampón de extracción y una cantidad definida de sustrato (la cantidad precisa de sustrato es importante, ya que debe ser una cantidad limitante que sature sólo la primera línea cuando no existe enzima presente en la muestra de ensayo). El hisopo se rota vigorosamente dentro del líquido de extracción con el fin de liberar la muestra líquida de modo que esta se pueda mezclar con el ligando. Esta mezcla de reacción se incuba a temperatura ambiente durante un período de tiempo definido (por ej., 10 minutos).

10 Paso 2: Al final del período de incubación, el hisopo se retira o se extrae del vástago y se cierra la tapa abatible de la parte superior. A continuación, el tubo se invierte y se presiona de modo que cuatro gotas de líquido caigan sobre la almohadilla de recepción de la muestra. A medida que el líquido migra hacia la tira de ensayo, este se pone en contacto con los anticuerpos de oveja secos unidos a las partículas de oro. Estos se hidratan con la muestra de ensayo y los anticuerpos de oveja se unen a cualquier sustrato no modificado. A medida que el líquido y las partículas de oro se mueven a través de la tira de ensayo de flujo lateral, se encuentra con la primera línea, donde se reconoce y captura la biotina (del sustrato). Toda partícula de oro unida al sustrato intacto se captura en la primera línea mediante la biotina terminal del sustrato. Aquellas que no se han unido al sustrato, o si están unidas a un sustrato escindido, pasan y son capturadas en la segunda línea (anti-oveja).

20 El usuario observa las líneas que se han formado y evalúa sus intensidades relativas. La ausencia de una primera línea y la presencia de una segunda línea de intensidad fuerte indica una elevada concentración de proteasa en la muestra de ensayo. El resultado opuesto indica un cero o una baja concentración de proteasa, por debajo del límite detectable. Las etapas entre estos extremos indican diferentes niveles de proteasa en la muestra de ensayo. En algunas realizaciones, el resultado se lee mediante un lector de tira optoelectrónico y las lecturas se interpretan automáticamente mediante un algoritmo simple, presentándose al usuario un resultado simple.

25 En una variación de este ejemplo, las partículas de oro (que llevan los anticuerpos de oveja) se añaden a la mezcla de reacción al final del período de incubación en lugar de incorporarse a la tira de ensayo.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de detección de enzimas para la detección de la presencia en una muestra de una enzima capaz de modificar un sustrato proporcionado que comprende:
- 5 (i) un medio cromatográfico o un soporte sólido
(ii) un sustrato que comprende una región de unión y una región de modificación sensible a la modificación por la enzima de un estado no modificado a un estado modificado;
10 (iii) una primera molécula de reconocimiento de la captura inmovilizada sobre o en el medio cromatográfico o en el soporte sólido capaz de unir la región de unión del sustrato;
(iv) una molécula de reconocimiento del sustrato capaz de unir específicamente la región de modificación en el estado no modificado, siendo el sitio de unión de la molécula de reconocimiento del sustrato, de tal forma que la región de modificación del sustrato se une preferencialmente a dicha molécula de reconocimiento del sustrato, comparado con la enzima cuando está mezclada y
15 (v) un indicador detectable unido a la molécula de reconocimiento del sustrato.
2. Un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la región de unión es un ligando no modificable.
- 20 3. Un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 que comprende además una segunda molécula de reconocimiento de la captura, inmovilizada sobre o en el medio cromatográfico y capaz de unir la molécula de reconocimiento del sustrato, opcionalmente en combinación con un fragmento del sustrato.
- 25 4. Un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la enzima es una hidrolasa, preferiblemente una peptidasa, lipasa, nucleasa, carbohidrasa, fosfatasa, sulfatasa, neuraminidasa, esterasa, ADNasa, ARNasa, una quinasa, una glucosiltransferasa, una oxidasa, una reductasa o una transaminasa.
- 30 5. Un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el indicador detectable está covalentemente unido a la molécula de reconocimiento del sustrato y/o en el que el indicador es un fluoróforo, una partícula de oro, un cromógeno, un compuesto luminiscente, un compuesto radiactivo, un compuesto visible, un liposoma u otra vesícula que contiene sustancias productoras de señales, una especie electroactiva o una combinación de una enzima y su sustrato.
- 35 6. Un dispositivo de detección de enzimas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende un primer y segundo sustratos, comprendiendo cada uno de ellos una región de modificación, siendo la región de modificación del primer sustrato sensible a la modificación por una primera enzima, siendo la región de modificación del segundo sustrato sensible a la modificación por una segunda enzima.
- 40 7. Un procedimiento de detección de una enzima capaz de modificar un sustrato que comprende los pasos de:
- (i) proporcionar un sustrato que comprende una región de unión y una región de modificación sensible a la modificación por la enzima de un estado no modificado a un estado modificado, proporcionando un soporte sólido y uniendo la región de unión del sustrato al soporte sólido, proporcionando una primera molécula de reconocimiento de la captura, capaz de unir la región de unión sobre el soporte sólido;
45 (ii) proporcionar una muestra sospechosa de contener una enzima;
(iii) proporcionar una molécula de reconocimiento del sustrato a la cual se acopla un indicador detectable, en la que la molécula de reconocimiento del sustrato une específicamente la región de modificación en el estado no modificado, siendo el sitio de unión de la molécula de reconocimiento del sustrato, de tal forma que la región de modificación del sustrato se une preferencialmente a dicha molécula de reconocimiento del sustrato, comparado con la enzima cuando está mezclada;
50 (iv) mezclar la muestra y el sustrato, de tal forma que al menos parte de la enzima de la muestra modifique el sustrato;
(v) poner en contacto el sustrato y la molécula de reconocimiento del sustrato y detectar la presencia del indicador; o
55 (i) proporcionar un sustrato que comprende una región de unión y una región de modificación sensible a la modificación por la enzima de un estado no modificado a un estado modificado;
(ii) proporcionar una muestra sospechosa de contener una enzima;
60 (iii) proporcionar una molécula de reconocimiento del sustrato a la cual se acopla un indicador detectable, en la que la molécula de reconocimiento del sustrato une específicamente la región de modificación en el estado no modificado, siendo el sitio de unión de la molécula de reconocimiento del sustrato, de tal forma que la región de modificación del sustrato se une preferencialmente a dicha molécula de reconocimiento del sustrato, comparado con la enzima cuando está mezclada;
65 (iv) mezclar la muestra y el sustrato, de tal forma que al menos parte de la enzima de la muestra modifique el sustrato;
(v) depositar el sustrato y la molécula de reconocimiento del sustrato sobre o en un medio cromatográfico,

en el que el medio cromatográfico comprende una primera molécula de reconocimiento de la captura inmovilizada sobre o en el medio cromatográfico, siendo la primera molécula de reconocimiento del sustrato capaz de unir la región de unión, poner en contacto el sustrato y la molécula de reconocimiento del sustrato y detectar la presencia del indicador.

- 5
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 en el que la región de unión es un ligando no modificable.
9. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 7 ó 8 que comprende además una segunda molécula de reconocimiento de la captura inmovilizada sobre o en el medio cromatográfico, siendo la segunda molécula de reconocimiento de la captura capaz de unir la molécula de reconocimiento del sustrato, opcionalmente en combinación con un fragmento del sustrato, en el que el procedimiento comprende el paso de detectar la presencia de la molécula de reconocimiento del sustrato en la segunda molécula de reconocimiento de la captura.
- 10
10. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la enzima es una hidrolasa, preferiblemente una peptidasa, lipasa, nucleasa, homooligosacaridasa o heterooligosacaridasa, homopolisacaridasa o heteropolisacaridasa, carbohidrasa, fosfatasa, sulfatasa, neuraminidasa, esterasa, ADNasa, ARNasa, una quinasa, una glucosiltransferasa, una oxidasa, una reductasa o una transaminasa.
- 15
11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 el indicador detectable está covalentemente unido a la molécula de reconocimiento del sustrato y/o en el que el indicador es un fluoróforo, una partícula de oro, un cromógeno, un compuesto luminiscente; un compuesto radiactivo, un compuesto visible, un liposoma u otra vesícula que contiene sustancias productoras de señales, una especie electroactiva o una combinación de una enzima y su sustrato.
- 20
12. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 en el que el paso (i) comprende proporcionar un primer y segundo sustratos, comprendiendo cada uno de ellos una región de modificación, siendo la región de modificación del primer sustrato sensible a la modificación por una primera enzima, siendo la región de modificación del segundo sustrato sensible a la modificación por una segunda enzima y en el que el paso (v) comprende la detección de la interacción entre el primer y segundo sustratos y la molécula de reconocimiento del sustrato.
- 25
- 30
13. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 en el que el paso (iii) comprende proporcionar una primera y segunda moléculas de reconocimiento del sustrato, uniendo cada una de ellas específicamente la región de modificación del primer y segundo sustratos, respectivamente, en el estado no modificado, siendo la región de modificación del primer sustrato preferencialmente unida por dicha primera molécula de reconocimiento del sustrato comparado con la primera enzima y siendo la región de modificación del segundo sustrato preferencialmente unida por dicha segunda molécula de reconocimiento del sustrato comparado con la segunda enzima y en el que el paso (v) comprende la detección de la interacción entre el primer y segundo sustratos y la primera y segunda moléculas de reconocimiento del sustrato.
- 35
- 40

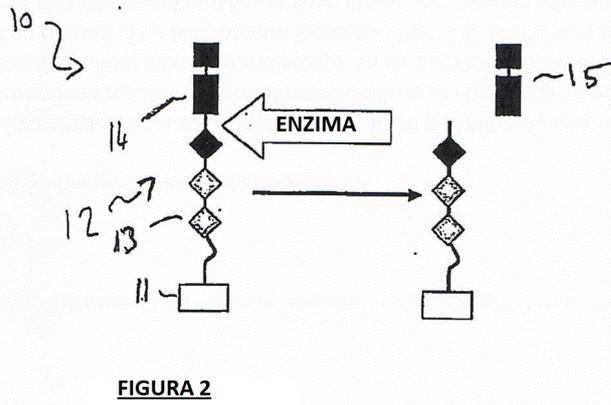
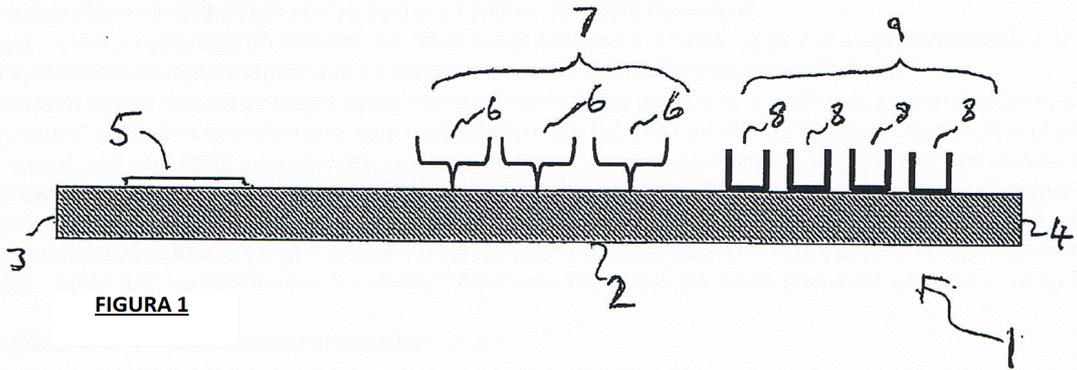


FIGURA 3

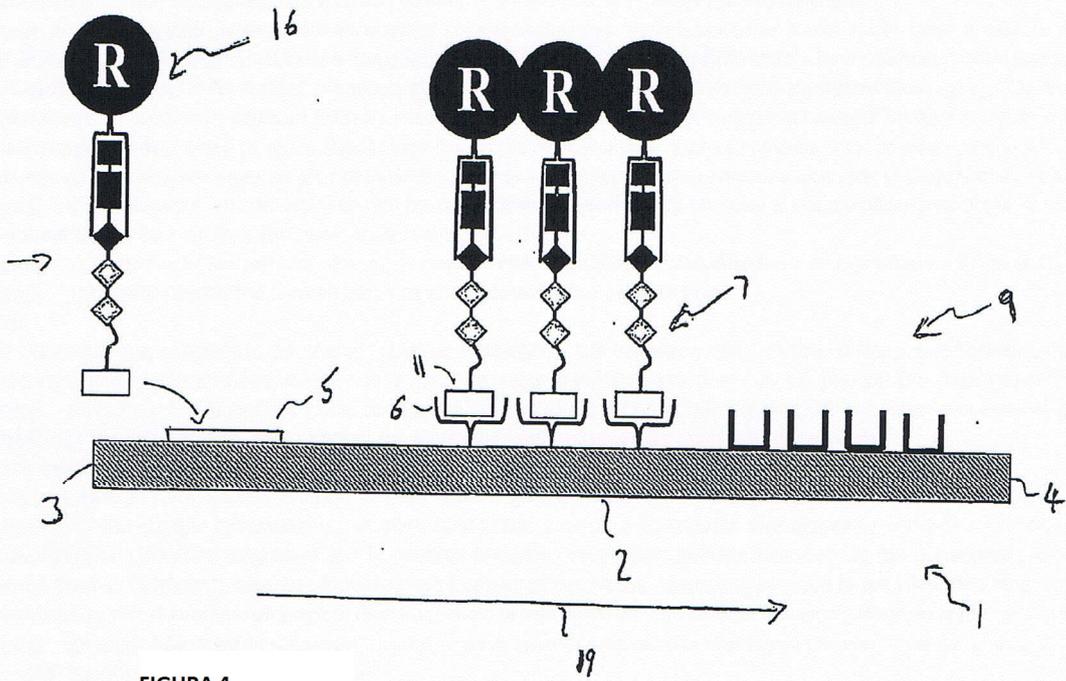
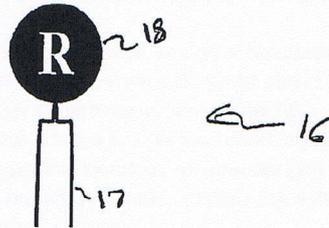


FIGURA 4

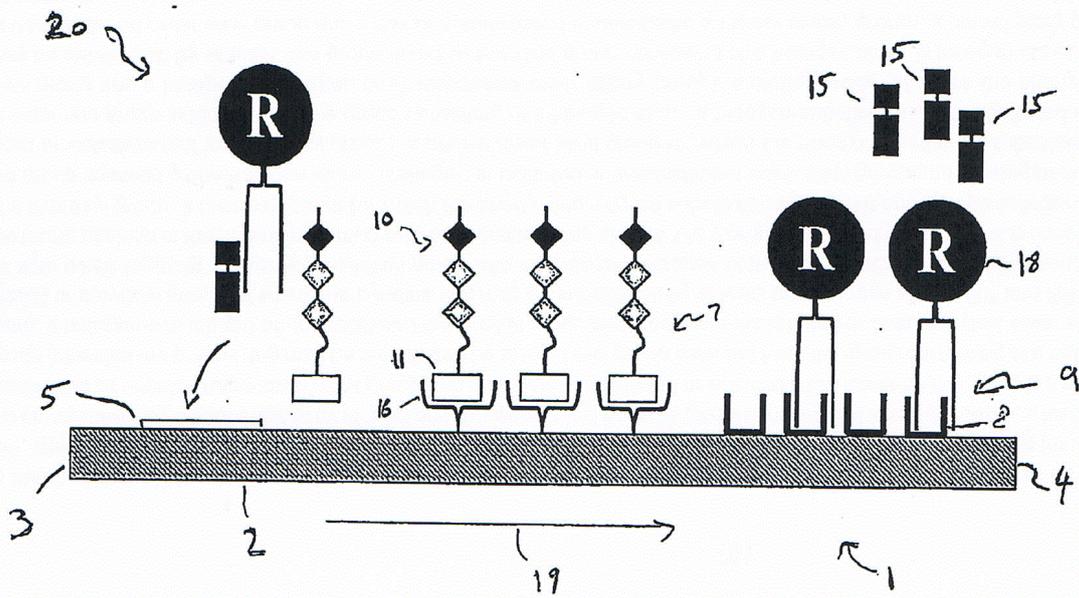


FIGURA 5