

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 232**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2004 E 04809060 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 1711818**

54 Título: **Kit de test para detectar enfermedad periodontal**

30 Prioridad:

30.01.2004 US 540296 P

30.01.2004 SE 0400191

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.02.2013

73 Titular/es:

**TENDERA AB (100.0%)
ERIK DAHLBERGSGATAN 11B
411 26 GÖTEBORG, SE**

72 Inventor/es:

**BENGTSSON, THOMAS y
WIKSTRÖM, MAUDE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 396 232 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 de test para detectar enfermedad periodontal

Campo Técnico

5 La presente invención se refiere a un kit de test para detectar enfermedad periodontal. La presente descripción se refiere adicionalmente a un método para la diagnosis y predicción del riesgo progresión de enfermedad periodontal.

Antecedentes de la Técnica

10 La periodontitis afecta aproximadamente al 7-15% de los adultos en el mundo occidental, lo que hace de ella una de las enfermedades más comunes. Es una enfermedad multifactorial en la que la presencia de bacterias patógenas en una bolsa entre el diente y la encía es un criterio necesario pero no suficiente. Los sistemas inflamatorio e inmunitario del hospedador juegan también un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad. Se cree que la progresión de la periodontitis es una respuesta inflamatoria crónica a bacterias subgingivales, que da como resultado la destrucción de los tejidos de soporte del diente. Es cíclica en su comportamiento y puede permanecer inadvertida en su fase inicial.

15 Se cree que el proceso destructivo es el resultado de una interacción compleja entre el sistema de defensa del hospedador y especies bacterianas específicas en la bolsa periodontal. Las bacterias patógenas implicadas en la aparición y la progresión de la enfermedad periodontal incluyen, pero sin carácter limitante, *Porphyromonas gingivalis* (anteriormente *Bacteroides gingivalis*), *Bacteroides forsythus* (denominada también ahora *Tannerella forsythensis*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Triponema denticola* y *Prevotella intermedia*.

20 En los últimos años ha sido estudiada detalladamente la importancia de los productos de virulencia de las bacterias (principalmente toxinas y enzimas), y se cree que juega un papel principal en la patogénesis (Eley y Cox (2003)). Se cree que las bacterias pasan por fases de crecimiento diferentes y durante estas fases son más o menos destructivas en la bolsa periodontal. Las bacterias activas originan productos de virulencia que favorecen su supervivencia y nutrición en la bolsa periodontal. Durante los periodos de actividad bacteriana elevada, dichos productos de virulencia contribuyen a la destrucción de los tejidos de soporte del diente y la reducción en la eficacia de los sistemas de defensa del hospedador.

25 Los dentistas actuales evalúan la periodontitis por medición de la profundidad de sonda de la bolsa periodontal, examinando imágenes de rayos X de la fijación del diente al hueso alveolar, y hacen referencia a la hemorragia durante el sondeo. Los factores de riesgo incluyen hábitos de fumar, estrés e historia familiar de periodontitis. El método está basado sólidamente en la experiencia subjetiva del dentista. La profundidad de la sonda es solamente una medida de la pérdida de fijación histórica, aportando así escaso apoyo a la existencia real de la periodontitis o la progresión futura de la misma. La hemorragia durante el sondeo podría indicar un proceso de curación en lugar de un proceso destructivo.

30 Ocasionalmente, se toma una muestra microbiológica y se envía a un laboratorio para análisis sea por cultivo o técnicas de DNA (técnica de hibridación Checkerboard DNA-DNA desarrollada por Socransky (1994)). Sin embargo, la respuesta se obtiene en un tiempo aproximado de una semana y muestra únicamente la presencia de ciertas bacterias, lo cual no indica necesariamente periodontitis.

35 Se han realizado cantidades enormes de trabajo para encontrar un compuesto químico, principalmente una proteína, tal como una enzima o una citoquina, en fluidos procedentes de la cavidad oral de un paciente, tales como el fluido gingival crevicular (GCF), que pueda diagnosticar o predecir la progresión de la periodontitis.

40 Hasta ahora se han desarrollado varios tests y ensayos (Armitage (2003)). Estos ensayos se han dedicado a identificar bacterias, productos de virulencia bacterianos o proteínas del hospedador.

45 Las proteínas derivadas del hospedador que se han investigado por su valor de diagnóstico o pronóstico en la periodontitis incluyen principalmente productos del sistema inflamatorio humano. El papel de estas proteínas es orquestar la respuesta inflamatoria e inmunitaria, remodelar el tejido o ayudar a la destrucción de las bacterias invasoras.

50 Las proteínas más estudiadas derivadas del hospedador que se han propuesto para diagnóstico de la periodontitis incluyen las serina-proteasas naturales (catepsina G, azurocidina, proteinasa 3, elastasa), colagenasa, aminotransferasas (Patentes US Nos. 4.981.787, 5.834.226 y 4.801.535), fosfatasa alcalina, β-glucuronidasa (Patente US No. 6.277.587), dipeptidil-peptidasa, lipocalina relacionada con la gelatinasa de los neutrófilos (Patente US No. 5.866.432), metaloproteinasas de la matriz (Patentes US Nos. 5.736.341 y 6.280.687) y citoquinas tales como interleuquinas (especialmente IL-1β (Patente US No. 5.328.829), IL-6 e IL-8) y mediadores inflamatorios tales como prostaglandina E₂ y el factor alfa de necrosis tumoral (TNF-α).

Se han sugerido metaloproteínas de la matriz (MMP's) como marcador de la enfermedad periodontal. La patente US No. 5.736.341 describe la detección de la presencia de MMP-8, la patente US No. 5.866.432 describe la detección

- de la presencia de la lipocalina relacionada con la gelatinasa de los neutrófilos, y la patente US No. 6.280.687 describe la presencia de MMP-13. Estas tres patentes sugieren un test rápido del lado de la silla basado en el principio inmunocromatográfico para la diagnosis y predicción de la progresión de la periodontitis. Sin embargo, en el documento informativo de la Asociación Americana de Periodontología por Oringer (2002) se sostiene que son necesarios estudios adicionales a fin de comprobar el papel de las MMP's en la progresión de la enfermedad periodontal.
- 5 La patente US No. 6.406.873 reivindica que dos mediadores inflamatorios (el inhibidor 2 del activador del plasminógeno y el activador del plasminógeno tisular) solos o en combinación pueden diagnosticar la periodontitis.
- 10 La patente US No. 5.248.595 describe un método para analizar simultáneamente hasta tres patógenos periodontales diferentes.
- 15 Chapple (1997) ha revisado los métodos tradicionales y empleados actualmente de diagnosis periodontal y concluye que la detección de marcadores, tales como la presencia de fosfatasa alcalina en el fluido del espacio subgingival, son más sensibles y específicas en comparación con las evaluaciones clínicas, tales como el análisis del color del tejido, el sondeo de la profundidad de la bolsa y la medida de la movilidad del diente. Chapple concluye también que la combinación de dos o más de tales marcadores puede producir el medio más exacto para la diagnosis de la actividad de la enfermedad en curso o futura, pero no presenta ninguna de tales combinaciones.
- Jin et al. (1999) han estado investigando la correlación entre la presencia de patógenos periodontales, es decir bacterias, utilizando métodos de sondeo de DNA, en la bolsa periodontal y elastasa en el fluido del espacio subgingival (GCF).
- 20 Nisengard et al. (1992) han descrito un test rápido de aglutinación de látex para la presencia de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*.
- Lamster et al. (1994) han investigado la pérdida clínica de fijación y su correlación con la β -glucuronidasa de los leucocitos humanos.
- 25 Eley y Cox (1996) han desarrollado un test del lado de la silla basado en un sustrato enzimático específico para la gingipaina de *P. gingivalis*.
- 30 US 2002/0012944 (Xiao et al) da a conocer que la existencia y la extensión de la enfermedad periodontal pueden ser diagnosticadas por medida de los niveles del inhibidor 2 del activador del plasminógeno (PAI-2) y/o del activador del plasminógeno tisular (t-PA) en el fluido gingival crevicular (GCF). Los niveles de PAI-2 y t-PA en GCF aumentan bruscamente en el contexto de la enfermedad periodontal, y están correlacionados también con la gravedad de la enfermedad en sitios diferentes en el mismo paciente.
- 35 Okada, H et al (Oral Diseases (1996) 2, 87-95) describen estrategias de diagnóstico basadas en los mecanismos moleculares causantes de la periodontitis. Se estudiaron factores bacterianos tales como células bacterianas y citoquinas o mediadores proinflamatorios. Los autores afirman que los marcadores diagnósticos serían factores patógenos e inflamatorios que participan en la destrucción del tejido conectivo periodontal y el hueso.
- 40 En Lee et al (Kaohsiung J Med Sci (2003) 19, 406-414) presenta un estudio de investigación de la activación de procesos inflamatorios en la enfermedad periodontal por evaluación cuantitativa de VEGF, MCP-1 e IL-8 en GCF y de bacterias en muestras de la placa subgingival. Se encontró que había significativamente más VEGF e IL8 en sitios de periodontitis crónica y gingivitis que en sitios periodontalmente sanos.
- 45 Hasta la fecha, se han desarrollado muchos métodos para evaluación de la actividad de la enfermedad periodontal. Sin embargo, ninguno de estos métodos mencionados anteriormente proporciona un ensayo específico y lo bastante sensible para diagnosticar la periodontitis y el patrón destructivo de la misma. Una consecuencia de los métodos inespecíficos es que diversos pacientes serán tratados sin sufrir realmente periodontitis. Las observaciones clínicas tales como la profundidad de la sonda no son suficientemente fiables dado que las bolsas profundas no albergan necesariamente una inflamación en curso, teniendo que combinarse evaluaciones radiográficas con observaciones clínicas detalladas a fin de aportar una diagnosis exacta, y la mera presencia de bacterias patógenas en la bolsa periodontal no refleja exactamente la actividad de la enfermedad. Además, las diagnosis desarrolladas hasta ahora basadas en métodos enzimáticos para proteínas del hospedador o derivadas de bacterias no han sido suficientemente específicas debido al hecho de que un sustrato enzimático puede ser escindido por una multitud de enzimas diferentes.
- 50 Se han estudiado también diferentes citoquinas, pero no se ha diseñado ningún test rápido y específico.
- Así pues, el dentista se halla en necesidad de un kit de test del lado de la silla que, preferiblemente:
- sea rápido, aportando resultados en pocos minutos;
 - requiera una cantidad mínima de tiempo y esfuerzo de trabajo;
 - sea resistente y pueda manipularse rigurosamente en el ambiente de la clínica;

- proporcione resultados fácilmente interpretados;
- tenga una vida útil larga a la temperatura ambiente o en un frigorífico;
- se adapte a la bandeja en la clínica dental, sea respetuoso con el medio ambiente y proporcione material satisfactorio de información al paciente.

5 Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es resolver los inconvenientes de la técnica anterior y proporcionar un kit de test que satisfaga las necesidades presentes de los dentistas. Más específicamente, la presente invención está orientada a proporcionar un kit de test para la detección de enfermedades periodontales que es específico, sensible y fácil de utilizar.

- 10 Los autores de la presente invención han encontrado que un kit de test que permite la detección de la coexistencia de una sustancia originaria de bacterias y una sustancia originaria del sistema inmunitario o inflamatorio humano puede utilizarse para este propósito.

- 15 La presente invención puede utilizarse para ayudar a los dentistas e higienistas dentales a proporcionar a sus pacientes un tratamiento más eficiente de la enfermedad periodontal. El kit de test y el método de acuerdo con la invención pueden utilizarse para el cribado de dientes sospechosos, para seguir el tratamiento previo, decidir la forma más apropiada de tratamiento, seleccionar la clase adecuada de antibióticos y comunicar al paciente la importancia de una higiene dental diaria satisfactoria.

- 20 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un kit de test para diagnosticar la enfermedad periodontal en un paciente por análisis de una muestra de la cavidad oral del paciente, comprendiendo dicho kit un primer ensayo de detección para detectar una primera sustancia originaria de bacterias, comprendiendo dicho primer ensayo de detección:

- i. un primer anticuerpo que exhibe fijación selectiva a dicha primera sustancia, y
- ii. medios para generar una respuesta detectable,

- 25 siendo dicha primera sustancia arg-gingipaína de *Porphyromonas gingivalis*, y un segundo ensayo de detección para detectar una segunda sustancia originaria del sistema inmunitario o inflamatorio del paciente, comprendiendo dicho segundo ensayo de detección:

- i. un segundo anticuerpo que exhibe fijación selectiva a dicha segunda sustancia, y
- ii. medios para generar una respuesta detectable,

siendo dicha segunda sustancia una elastasa de los neutrófilos humanos.

- 30 Preferiblemente, dicho paciente es un mamífero, muy preferiblemente un humano.

El resultado de dicho primer ensayo de detección en combinación con el resultado de dicho segundo ensayo de detección se utiliza para detectar la enfermedad periodontal.

La segunda sustancia es una elastasa de los neutrófilos humanos.

- 35 La coexistencia de una primera sustancia de origen bacteriano y una segunda sustancia como se ha definido anteriormente, elastasa de los neutrófilos humanos, indicaría a la vez bacterias activas y un sistema inmunitario o inflamatorio activo, lo que indica destrucción periodontal.

Es evidente que aun cuando está perfectamente establecido en la comunidad científica que la enfermedad periodontal es una enfermedad multifactorial, nadie ha desarrollado hasta ahora un test para analizar a la vez productos bacterianos y derivados del hospedador en una muestra.

- 40 El kit de test puede comprender también un tercer ensayo de detección que comprende al menos un tercer ligando de afinidad que tiene un sitio de fijación para fijar una tercera sustancia originaria de bacterias o del sistema inmunitario o inflamatorio del paciente como se ha definido anteriormente, preferiblemente de bacterias, y puede en algunas realizaciones comprender incluso ensayos de detección posteriores para fijación de sustancias adicionales.

- 45 El uso de anticuerpos es ventajoso con respecto a otros métodos (v.g. métodos enzimáticos) dado que los anticuerpos, una vez desarrollados y testados respecto a reactividad cruzada, son sumamente específicos para su diana y son capaces de detectar sustancias químicas distintas de enzimas, v.g. toxinas y citoquinas. Adicionalmente, métodos para el desarrollo de nuevos anticuerpos contra nuevos antígenos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

- 50 Preferiblemente, dichos ensayos de detección en el kit de test de acuerdo con la presente invención comprenden ensayos inmunocromatográficos.

Entre las ventajas de la utilización de ensayos/métodos inmunocromatográficos se encuentra el hecho de que los mismos se realizan y utilizan fácilmente, tienen una vida útil larga, producen una respuesta rápida y pueden diseñarse de modo que sean muy específicos para las sustancias que se pretende detectar.

Dicho kit de test comprende además preferiblemente un soporte proporcionado con un depósito de muestra para recibir una muestra, en el que dichos ensayos de detección primero y segundo están dispuestos sobre dicho soporte en contacto con dicho depósito de muestra, directamente o por vía de un medio de separación dispuesto de modo que puede retirarse, que separa dicho depósito de muestra de dichos ensayos de detección. Dicho kit puede comprender también tampones adicionales, preferiblemente en un depósito de tampón separado de dicho depósito de muestra, para dilución y adaptación de dicha muestra para dichos ensayos de detección, y al menos un dispositivo de muestreo para obtención de la muestra.

Los ensayos de detección individuales comprendidos en el kit de test de acuerdo con la presente invención se proporcionan juntos. En el caso en que los ensayos de detección se vendan por separado, muestras de GCF etc, tomadas concomitantemente se analizan por separado en cada ensayo, y los resultados se combinan para la diagnosis de la enfermedad periodontal.

El kit de test de acuerdo con la presente invención proporciona un test del lado de la silla para la enfermedad periodontal, en el que el dentista o un higienista dental toma v.g., una muestra de GCF de una bolsa periodontal. La muestra es analizada por los ensayos proporcionados en el kit de test y los resultados de estos ensayos se interpretan de acuerdo con criterios predefinidos para evaluar la existencia de enfermedad periodontal en curso.

Un método para diagnosis de enfermedades periodontales y/o para la predicción del riesgo de progresión de dichas enfermedades comprende analizar una muestra de la cavidad oral de un paciente respecto a la presencia de al menos una primera sustancia originaria de bacterias y la presencia de una segunda sustancia originaria del sistema inmunitario o el sistema inflamatorio del paciente, siendo dichas sustancias primera y segunda como se han definido anteriormente.

Además, dicho método de diagnóstico puede comprender también un método para detectar la presencia de sustancias adicionales como se ha indicado anteriormente.

Más preferiblemente, al menos uno de dichos métodos primero y segundo comprende la utilización de un ensayo inmunocromatográfico.

25 Breve descripción del dibujo

La Figura 1 muestra una realización de un kit de test en el cual dos ensayos inmunocromatográficos están dispuestos sobre un soporte equipado con un depósito de muestra.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un kit de test para la detección de enfermedad periodontal en un paciente por análisis de una muestra de la cavidad oral del paciente, en donde dicho kit comprende al menos un primer ensayo de detección que comprende al menos un primer ligando de afinidad que tiene un sitio de fijación para fijar una primera sustancia originaria de bacterias, y un segundo ensayo de detección que comprende al menos un segundo ligando de afinidad que tiene un sitio de fijación para fijar una segunda sustancia originaria del sistema inmunitario o inflamatorio del paciente de acuerdo con las reivindicaciones 1-6.

Preferiblemente, dicha muestra de la cavidad oral de un paciente es fluido gingival crevicular, fluido del surco peri-implante, saliva o una muestra de enjuagado bucal.

El fluido gingival crevicular (GCF) es un fluido que fluye desde la bolsa periodontal a la cavidad oral. En caso de inflamación, el GCF contiene células inflamatorias, bacterias y sus sub-productos respectivos, y su contenido puede utilizarse como marcador para periodontitis destructiva. La recogida del GCF es un procedimiento mínimamente invasivo, y el fluido proporciona una fuente cuantitativa de indicadores bioquímicos que refleja la respuesta del paciente así como la exposición a bacterias.

El fluido del surco peri-implante es el equivalente del GCF en el caso de que un diente esté reemplazado con un implante dental, es decir un fluido que fluye desde el sitio del implante a la cavidad oral.

Se prefieren GCF y fluido del surco peri-implante si se requiere una detección específica del sitio de las sustancias primera y segunda, dado que pueden obtenerse muestras distintas de cada superficie del diente examinada.

Pueden utilizarse muestras de saliva o enjuagado bucal para obtener una detección o diagnosis que no es de acción específica.

Como se utiliza en esta memoria, el término "enfermedad periodontal" y periodontitis debe interpretarse en su sentido más amplio para abarcar enfermedades tales como periodontitis, peri-implantitis (en la cual el tejido que soporta el implante está desintegrado), y otras formas de enfermedad periodontal como se definen en el Taller Internacional de 1999 para clasificación de las enfermedades y afecciones periodontales.

Bacterias patógenas periodontales, tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Triponea denticola* y *Prevotella intermedia* pueden estar presentes en la cavidad oral y en

la bolsa entre un diente y la encía sana sin que esto conduzca a la progresión de una enfermedad periodontal. Las bacterias precisan ciertas condiciones de crecimiento y la presencia de nutrientes para volverse activas. Una bacteria activa origina productos de virulencia (tales como las toxinas y enzimas mencionadas anteriormente) para favorecer su supervivencia y nutrición.

5 Tanto *Porphyromonas gingivalis* como *Bacteroides forsythus* producen enzimas proteolíticas conocidas como serina-proteasas semejantes a tripsina, con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Una de las proteasas de *P. gingivalis* se conoce como arg-gingipaina, y una de las proteasas de *B. forsythus* es una proteasa de 48 kDa. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* producen una leucotoxina de 116 kDa que es un miembro de la familia de exoproteínas "Repeats-in-Toxin" de leucotoxinas formadoras de poros y es específicamente citotóxica para los
10 leucocitos polimorfonucleares humanos.

De acuerdo con la invención, dicha primera sustancia es un producto de virulencia bacteriana que es arg-gingipaina de *Porphyromonas gingivalis*.

15 La presencia de productos de virulencia puede desencadenar una respuesta inflamatoria y el sistema inmunitario del hospedador, reclutando así células del sistema de defensa, v.g. leucocitos polimorfonucleares (PMN), en el sitio de infección.

Los leucocitos no pueden hacer frente a las altas cantidades de bacterias y productos bacterianos en el sitio infectado, y enzimas de los granulados leucocitarios se liberan en la bolsa periodontal. Estas enzimas, orientadas originalmente a destruir las bacterias invasoras, son altamente destructivas para los tejidos circundantes. Se ha demostrado que la elastasa de los neutrófilos humanos degrada muchos de los tejidos de soporte que rodean un
20 diente. La elastasa se encuentra a menudo ligada a su inhibidor de proteasas (antitripsina α -1) en la bolsa periodontal. Sin embargo, se ha demostrado que la proteasa de *P. gingivalis* degrada los inhibidores de proteasas α -1 antitripsina y α -2 macroglobulina en el suero humano, dejando la elastasa en su forma altamente destructiva en la bolsa periodontal o peri-implante.

25 Como se utiliza en esta memoria, la expresión sustancias "que proceden del sistema inmunitario o inflamatorio" hace referencia a sustancias que proceden de células implicadas en el sistema inmunitario o inflamatorio. Tales sustancias pueden ser secretadas por dichas células, o pueden proceder de la lisis de tales células, por ejemplo para orquestar la respuesta inmunitaria e inflamatoria o para remodelar el tejido o destruir las bacterias invasoras.

La segunda sustancia es un producto leucocitario, una serina-proteasa natural, la elastasa de los neutrófilos humanos. Otras sustancias comprenden citoquinas, tal como una interleuquina seleccionada preferiblemente de
30 entre interleuquina-1 β , interleuquina-6 e interleuquina-8, o un mediador inflamatorio, preferiblemente el factor- α de necrosis tumoral o posiblemente prostaglandina E₂.

Dicha segunda sustancia es elastasa de neutrófilos humanos.

35 Otras sustancias procedentes del sistema inmunitario o inflamatorio del paciente, adecuadas para detección de acuerdo con la presente invención comprenden, pero sin carácter limitante, colagenasas, aminotransferasas, fosfatasa alcalina, β -glucuronidasa, dipeptidil-peptidasa, lipocalina relacionada con la gelatinasa de los neutrófilos y metaloproteinasas de la matriz.

Dicha primera sustancia es un producto de virulencia bacteriano de acuerdo con la reivindicación 1, y dicha segunda sustancia es elastasa de neutrófilos humanos.

40 La coexistencia de al menos una primera sustancia de origen bacteriano y una segunda sustancia como se ha definido anteriormente, elastasa de neutrófilos humanos, indicaría a la vez bacterias activas y un sistema inmunitario o inflamatorio activo, siendo esto indicativo de enfermedad periodontal. Así pues, es ventajoso detectar la coexistencia de al menos dichas primeras sustancias y dichas segundas sustancias.

45 En algunos casos, el kit de test de acuerdo con la presente invención comprende ensayos adicionales de detección para la detección de sustancias adicionales en dicha muestra, seleccionándose preferiblemente tales sustancias adicionales entre sustancias originarias de bacterias como se ha definido anteriormente.

El kit de test de acuerdo con la presente invención comprende un primer anticuerpo que exhibe fijación selectiva a dicha primera sustancia, y comprende un segundo anticuerpo que exhibe una fijación selectiva a dicha segunda sustancia.

50 Como se utiliza en esta memoria, "anticuerpo" hace referencia a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos o equivalentes de anticuerpos producidos por síntesis y fragmentos funcionales de los mismos.

Anticuerpos de interés especial para la presente invención son anticuerpos que se fijan específicamente a cualquiera de las sustancias primera o segunda anteriormente mencionadas. Anticuerpos generados contra la elastasa de los neutrófilos humanos están disponibles comercialmente de MP Biomedicals. Se han desarrollado anticuerpos contra

la leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* (Johansson et al. 2000), habiéndose desarrollado también anticuerpos contra la proteasa de *P. gingivalis* (Nakagawa et al. 2001).

5 Como se utiliza en esta memoria, un "ensayo" hace referencia a medios para detectar la presencia y/o determinar la cantidad de una o más sustancias en una muestra. El resultado de un análisis en un ensayo es una respuesta detectable, por ejemplo como un cambio de color, fluorescencia, absorbancia y/o luminiscencia, un cambio de conductividad, un cambio de radioactividad, etc.

10 Los ensayos de detección adecuados para uso con el kit de test de acuerdo con la presente invención pueden estar basados en uno de varios métodos inmunológicos. Tales métodos incluyen, pero sin carácter limitante, métodos inmunocromatográficos, métodos inmunométricos, métodos de inmunoaglutinación, métodos fluoroinmunológicos, métodos de inmunoluminiscencia, métodos inmunológicos turbidimétricos, ELISA y métodos nefelométricos.

15 En una realización preferida del kit de test de acuerdo con la presente invención, dichos ensayos de detección primero y segundo proporcionan ensayos inmunocromatográficos, materializados preferiblemente como un denominado "test de tira", implementado como un test de flujo lateral. Existen varias variantes diferentes de ensayos inmunocromatográficos conocidas por los expertos en la técnica. Cada ensayo inmunocromatográfico emplea preferiblemente dos anticuerpos específicos para diferentes epítopes de la sustancia a detectar.

Adicionalmente, puede adaptarse más de un ensayo de detección a un solo test de tira, con lo que puede detectarse específicamente la presencia de dos o más sustancias en una sola tira.

20 Además, un ensayo inmunocromatográfico puede estar diseñado de tal modo que sea necesaria una cantidad umbral predefinida de la sustancia buscada en la muestra para proporcionar una señal positiva, como es conocido por los expertos en la técnica.

Se proporciona un método para diagnóstico de enfermedades periodontales y/o predicción del riesgo de progresión de tales enfermedades, comprendiendo dicho método analizar una muestra de la cavidad oral de un paciente en cuanto a la presencia de al menos una primera sustancia originaria de bacterias y la presencia de una segunda sustancia originaria del sistema inmunitario o inflamatorio del paciente.

25 En el método, la muestra de la cavidad oral de un paciente y las sustancias primera y segunda son como se ha definido anteriormente.

Asimismo, en algunos casos, el método de diagnóstico comprende además el paso de detectar la presencia de sustancias adicionales como se han definido anteriormente en dicha muestra.

30 En realizaciones preferidas del método de diagnóstico, dicho primer método comprende utilizar un primer anticuerpo que exhibe fijación selectiva de dicha primera sustancia y dicho segundo método comprende utilizar un segundo anticuerpo que exhibe fijación selectiva de dicha segunda sustancia, en donde dichos anticuerpos son como se ha definido anteriormente.

Muy preferiblemente, al menos uno de dichos métodos primero y segundo comprende utilizar un método inmunocromatográfico.

35 Otros métodos de detección adecuados para uso con los métodos pueden estar basados en uno de varios métodos inmunológicos. Métodos de este tipo incluyen, pero sin carácter limitante, métodos inmunocromatográficos, métodos inmunométricos, métodos de inmunoaglutinación, métodos fluoroinmunológicos, métodos de inmunoluminiscencia, métodos inmunológicos turbidimétricos, ELISA y métodos nefelométricos.

Realizaciones preferidas

40 Preferiblemente, un kit de test de acuerdo con la invención, como se ilustra en la Figura 1, comprende dos ensayos de detección inmunocromatográficos 1, 2 dispuestos sobre un soporte 3 equipado con un depósito de muestra 4 para recibir una muestra. Los dos ensayos de detección 1, 2 están dispuestos, directamente o por vía de un medio de separación 5 dispuesto de modo que puede retirarse, en contacto con el depósito de muestra 4.

45 El depósito de muestra 4 está formado preferiblemente en el material soporte. El soporte 3 puede estar hecho de varios materiales diferentes, tales como plástico, papel, cartón o combinaciones de los mismos, tales como papel estratificado con plástico. Los ensayos de detección 1, 2 están fijados sobre el soporte 3 de tal manera que el área de recepción de la muestra de cada ensayo está, directamente o por vía de un medio de separación 5 dispuesto de modo que puede retirarse, en contacto con el depósito de muestra 4. Dicho medio de separación 5 puede ser una lámina delgada desplazable que cubre las áreas de recepción de la muestra en los ensayos, una chapa que separa
50 el depósito de los ensayos, etc.

El kit puede comprender además tampones adicionales para dilución y adaptación de dicha muestra para dichos ensayos de detección y al menos un dispositivo de muestreo para la obtención de la muestra a analizar. El tipo de dispositivo de muestreo adecuado para uso puede depender del tipo de muestra a analizar. Por ejemplo, el fluido

gingival creviculares un fluido viscoso y puede ser recogido fácilmente por un pequeño cepillo, una seda dental, una punta de papel o una pipeta desechable. Otros dispositivos de muestreo para obtención de una muestra de saliva o enjuagado bucal son conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, el tampón se mantiene separado del depósito de muestra en un depósito de tampón, tal como un frasco separado, un depósito adicional dispuesto sobre el soporte o proporcionando el tampón en una bolsa perforable dispuesta en el depósito de muestra.

Después de la obtención de una muestra, la misma se mezcla preferiblemente con tampón para obtener el pH, la concentración iónica y la viscosidad adecuadas para los ensayos de detección. Después de la mezcladura, la muestra se transfiere al depósito de muestra, y de este modo, opcionalmente por retirada del medio de separación, se pone en contacto con un área de recepción de los ensayos de detección.

Por flujo capilar, se deja que la muestra migre a lo largo de una tira de celulosa a otra área en la cual pequeñas partículas (por ejemplo oro coloidal o látex) recubiertas con anticuerpos específicos para un epítotope de la proteína (antígeno) a analizar por el ensayo de detección son atrapadas por el flujo del líquido. El antígeno presente en la muestra se fija a los anticuerpos unidos a las partículas y migra adicionalmente a lo largo de la tira de celulosa. Más abajo a lo largo del camino del flujo capilar, unido irreversiblemente a la tira, se encuentra otro anticuerpo (mono- o policlonal) que reconoce otro epítotope del antígeno. Las partículas que han atrapado un antígeno se fijan al área de la tira en la cual está fijado el segundo anticuerpo, quedando el antígeno intercalado entre los anticuerpos unidos a las partículas y a la tira respectivamente.

Si quedan atrapadas suficientes partículas en la misma área, se forma sobre la tira una línea visible (línea de test). Las partículas que no han atrapado un antígeno continúan avanzando a lo largo de la tira y algunas de ellas quedan atrapadas en una línea de control de función. Las partículas son demasiado pequeñas para ser visibles por el ojo humano una a una. Únicamente si quedan atrapadas suficientes partículas en la misma área se forma una línea visible.

El proceso anterior tiene lugar de modo esencialmente simultáneo en ambas tiras, con lo cual se obtiene en pocos minutos un resultado para cada una de las sustancias analizadas.

La realización preferida de la presente invención descrita anteriormente y el experimento siguiente se proporcionan únicamente para propósitos ilustrativos, y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención. El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Experimentos

Materiales y métodos

Las muestras para el estudio siguiente se obtuvieron de 16 individuos voluntarios que habían sido remitidos para tratamiento periodontal al Servicio Dental Público del Departamento de Periodontología, en Kristianstad, Suecia. La edad de los pacientes comprendía desde 28 a 54 años, con un promedio de 40. Todos los individuos tenían al menos 3 sitios con una profundidad de sonda mayor que o igual a 6 mm, localizados en dientes separados. Ninguno de los pacientes se hallaba médicamente en riesgo o había sido sometido a tratamiento periodontal y/o con antibióticos durante los 6 meses anteriores.

La toma de muestras y el examen clínico se realizaron por duplicado, con una semana de diferencia. Las muestras para análisis enzimático se recogieron antes del muestreo microbiano y el examen clínico. El primer muestreo y examen se realizó antes de administrar cualquier tratamiento (línea base, determinación 1). El segundo muestreo y examen se realizó 6 meses después de la terminación del primer tratamiento (determinación 2), y el tercero, otros 6 meses después de la finalización del segundo tratamiento (determinación 3).

Después del examen de la línea base, todos los pacientes recibieron instrucciones de higiene oral y desbridamiento supra- y subgingival de toda la dentadura. En la segunda sesión de tratamiento, se realizó cirugía periodontal o raspado bajo anestesia en todos los sitios en los que *P. gingivalis* constituía $\geq 0,5\%$ o *P. intermedia* $\geq 5\%$ del recuento viable anaerobio total, o estaba presente *A. actinomycetemcomitans* en las muestras subgingivales. Todos los restantes sitios seleccionados para el estudio recibieron pulimento supragingival.

De cada paciente, se recogieron muestras de 3 a 10 sitios con profundidades iniciales de sonda ≥ 6 mm. El área de muestreo se secó y se aisló con rollos de algodón y, supragingivalmente, se retiró con cuidado la placa con cucharillas estériles y compresas de algodón. Para los ensayos de enzimas, se insertaron consecutivamente 3 puntas de papel medio (Johnson y Johnson, Windsor, NJ) a una distancia aproximada de 1 mm en el surco periodontal y se dejaron durante 15 segundos. La parte húmeda de cada punta de papel se cortó con tijeras estériles y se reunió en un tubo Minisorb (Nunc, Roskilde, Dinamarca) que contenía 100 μ l de NaCl al 0,85%. Las muestras se congelaron inmediatamente a -20°C y en el transcurso de 6 horas a -80°C , y se guardaron hasta su ensayo. Para el análisis microbiano, se insertaron 3 puntas de papel consecutivamente en la bolsa periodontal hasta que se encontró resistencia y se dejaron permanecer durante 15 segundos. Se reunieron las puntas en un vial que contenía 10 perlas de vidrio, de 3 mm de diámetro, y 3,3 ml de medio de transporte VMGA III, preparado y guardado en condiciones aerobias. Las muestras se procesaron dentro de las 24 horas. Las bacterias se dejaron crecer en placas de agar Brucella enriquecidas y se identificaron por métodos apropiados.

Para el estudio de los valores de punto de corte apropiados para un test de diagnóstico se estudiaron elastasa de neutrófilos humanos y arg-gingipaína de *P. gingivalis* utilizando sustratos selectivos.

La primera serie de las muestras duplicadas se utilizó para los ensayos enzimáticos. Todas las muestras se descongelaron en hielo y se centrifugaron durante 3 minutos a 13.000 x g.

5 El sustrato enzimático para la determinación de arg-gingipaína de *P. gingivalis* era N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilina (BAPNA) con una concentración final de 1 mM en el tampón de ensayo que contenía 5% de DMSO. El tampón de ensayo era Tris-HCl 0,1 M que contenía CaCl₂ 5 mM, pH 7,5, con glicil-glicina 50 mM (como fue consignado anteriormente por los inventores en la patente US 5.981.164, gly-gly estimula selectivamente BAPNA en presencia de arg-gingipaína) y L-cisteína 5 mM. Se preincubaron 10 µl de la muestra durante 15 minutos con 140 µl del
10 tampón de ensayo en el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos, recubierta previamente con seroalbúmina bovina, antes de añadir 50 µl del sustrato. La placa se incubó a 37°C en una cámara húmeda, y la liberación de pNA se siguió espectrofotométricamente por lecturas de DO₄₀₅, utilizando un lector de placas de microtitulación, cada pocas horas desde las 12 a las 36 horas. Una unidad de actividad era igual a la cantidad de enzima que escindía 1 nmol del sustrato durante una hora de incubación.

15 El ensayo de elastasa se realizó por adición de 5 µl de GCF a un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía 145 µl de un tampón de ensayo (Tris 0,1 M, NaCl 0,5 M a pH 7,5). Después de 15 minutos, se inició la reacción por adición de 50 µl de una solución 2 mM de metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Valina-pNA en un tampón de ensayo que contenía 20% DMSO. La placa se incubó a 37°C en una cámara humidificada. La aplicación enzimática liberadora del pNA se leyó a DO₄₀₅ cada pocas horas desde las 12 a las 26 horas utilizando un lector de
20 placas de microtitulación (Molecular Devices) y se comparó con un estándar de enzima purificada diluida. Las lecturas registradas se representaron gráficamente contra el tiempo y se calculó la actividad enzimática como DA₄₀₅/60 minutos a partir de la parte lineal de la gráfica. La cantidad de elastasa se expresó en ng por sitio.

Se incluyeron en el estudio de puntos de corte pacientes con crecimiento de *P. gingivalis* o presencia de actividad de BAPNA estimulada por gly-gly pero sin crecimiento alguno de *A. actinomycetemcomitans*. Este criterio proporcionó
25 35 sitios de 8 pacientes diferentes. La determinación un año después del tratamiento inicial se utilizó en este estudio limitado. Como medida de la progresión ulterior de la enfermedad periodontal se utilizó la pérdida de fijación tal como se midió desde el fondo de la bolsa periodontal al borde raíz-cemento con una sonda de presión equilibrada. Se analizaron elastasa y arg-gingipaína en cuanto a su capacidad para predecir la pérdida ulterior de fijación. Individualmente, el nivel de punto de corte de la elastasa se ajustó a 20 ng por sitio y para arg-gingipaína a 0,27 unidades por sitio.
30

Resultados

<u>Elastasa</u>	Pérdida de fijación	Ganancia de fijación o cero
Test positivo (Elastasa >20 ng)	3	2
Test negativo (Elastasa ≤20 ng)	3	27

La elastasa como indicador de la pérdida ulterior de fijación proporcionaba una sensibilidad de 50% y una especificidad de 93%. Se calculó un valor p de 0,0264* utilizando el test exacto de Fisher.

<u>Arg-gingipaína</u>	Pérdida de fijación	Ganancia de fijación o cero
Test positivo (arg-gingipaína >0,27 U)	6	13
Test negativo (arg-gingipaína ≤0,27 U)	0	16

35 La arg-gingipaína como indicador de la pérdida ulterior de fijación proporcionaba una sensibilidad de 100% y una especificidad de 55%. Se calculó un valor p de 0,0216* utilizando el test exacto de Fisher.

Para elastasa y arg-gingipaína solas, tenía que sacrificarse la sensibilidad o la especificidad. Esto movió a los inventores a investigar la combinación de las dos enzimas. Se investigaron nuevos niveles de punto de corte para
40 las dos enzimas a fin de encontrar que el límite de detección para la elastasa fuese 2 ng por sitio y 0,30 unidades para arg-gingipaína.

Combinación	Pérdida de fijación	Ganancia de fijación o cero
Test positivo (Elastasa >2 ng y arg-gingipaína >0,30 U)	5	3
Test negativo (Elastasa ≤2 ng o arg-gingipaína ≤0,30 U)	1	26

5 La combinación de elastasa y arg-gingipaína como indicador de la pérdida ulterior de fijación proporcionó una sensibilidad de 83% y una especificidad de 90%. Se calculó un valor $p < 0,001$ *** utilizando el test exacto de Fisher. Estos datos limitados demuestran que la combinación de elastasa y arg-gingipaína como marcador para la enfermedad periodontal proporciona un test estadísticamente más significativo que cualquiera de las enzimas sola.

Referencias

Armitage G.C. (2003) Position paper: Diagnosis of Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology* 74, 1237-1247.

Chapple I.L.C (1997) Periodontal disease diagnosis: current status and future developments. *Journal of Dentistry* 25, 3-15.

Eley B.M. and Cox S.W. (1996) Correlation Between Gingivain/Gingipain and Bacterial Dipeptidyl Peptidase Activity in Gingival Crevicular Fluid and Periodontal Attachment Loss in Chronic Periodontitis Patients. A 2-Year Longitudinal Study. *Journal of Periodontology* 67, 703-716.

Eley B.M. and Cox S.W. (2003) Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defences and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000, 31, 105-124.

Jin L.J., Söder P-Ö. , Leung W.K., Corbet E.F., Samaranayake L.P., Söder B. and Davies W.I.R. (1999) Granulocyte elastase activity and PGE2 levels in gingival crevicular fluid in relation to the presence of subgingival periodontopathogens in subjects with untreated adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 26, 531-540.

Johansson A., Sandström G., Claesson R., Hånström L., Kalfas S. (2000) Anaerobic neutrophil-dependent killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in relation to the bacterial leukotoxicity. *European Journal of Oral Sciences* 108, 136-149.

Lamster I.B., Smith Q.T., Celenti R.S., Singer R.E. and Grbic J.T. (1994) Development of a risk profile for periodontal disease: microbial and host response factors. *Journal of Periodontology* 65 (5 Suppl), 511-20.

Nakagawa, T., Sims, T., Fan, Q., Potempa, J., Travis, J., Houston, L. and Page, R.C. (2001) Functional characteristics of antibodies induced by Arg-gingipain (HRgpA) and Lys-gingipain (Kgp) from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology* 16 (4), 202-211.

Nisengard R.J., Mikulski L., McDuffie D. and Bronson P. (1992) Development of a rapid latex agglutination test for periodontal pathogens. *Journal of Periodontology* 63 (7), 611-617.

Oringer R.J. (2002) Modulation of the Host Response in Periodontal Therapy. *Journal of Periodontology* 73, 460-470.

Socransky S.S., Smith C., Martin L., Paster B.J., Dewhirst F.E. and Levin A.E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17 (4), 788-92.

REIVINDICACIONES

1. Un kit de test para detectar la enfermedad periodontal en un paciente por análisis de una muestra de la cavidad oral del paciente, en el cual dicho kit comprende al menos:
- 5 un primer ensayo de detección para detectar una primera sustancia originaria de bacterias, comprendiendo dicho primer ensayo de detección:
- i. un primer anticuerpo que exhibe fijación selectiva a dicha primera sustancia, y
 - ii. medios para generar una respuesta detectable,
- siendo dicha primera sustancia arg-gingipaína de *Porphyromonas gingivalis*, y
- 10 un segundo ensayo de detección para detectar una segunda sustancia originaria del sistema inmunitario o inflamatorio del paciente, comprendiendo dicho segundo ensayo de detección:
- i. un segundo anticuerpo que exhibe fijación selectiva a dicha segunda sustancia, y
 - ii. medios para generar una respuesta detectable,
- siendo dicha segunda sustancia una elastasa de los neutrófilos humanos.
- 15 2. Un kit de test de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual cada uno de dichos ensayos de detección primero y segundo proporciona un ensayo inmunocromatográfico.
3. Un kit de test de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un soporte provisto de un depósito de muestra para recibir dicha muestra, en el cual dichos ensayos de detección primero y segundo están dispuestos sobre dicho soporte en contacto con dicho depósito de muestra, directamente o por vía de un medio de separación dispuesto de modo que puede retirarse, que separa dicho depósito de muestra de dichos ensayos de detección.
- 20 4. Un kit de test de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además tampones adicionales para dilución y adaptación de dicha muestra para dichos ensayos de detección.
5. Un kit de test de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende adicionalmente un depósito de tampón separado de dicho depósito de muestra.
- 25 6. Un kit de test de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente al menos un dispositivo de muestreo para la obtención de dicha muestra.

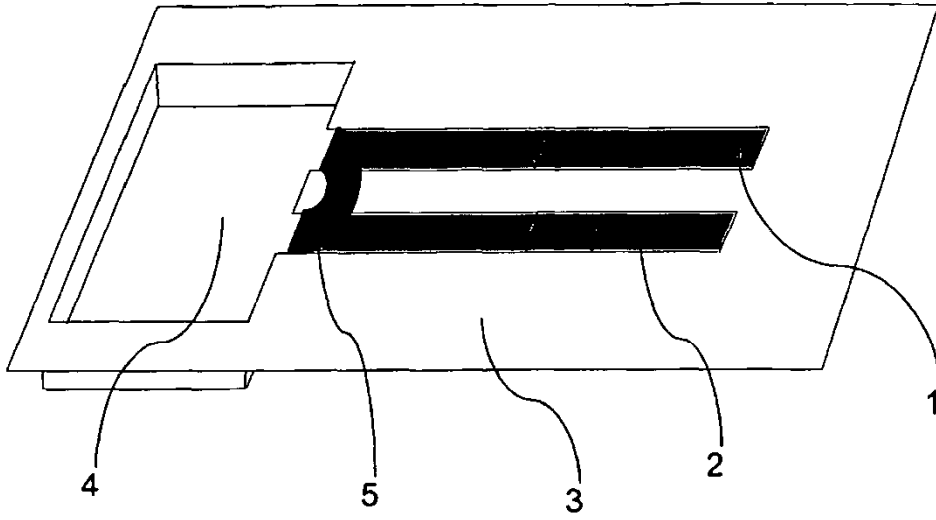


Fig. 1