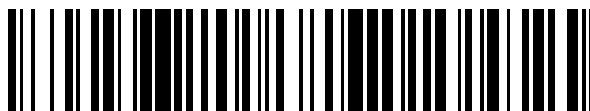


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 049**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2010 E 10774917 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2431740**

54 Título: **Método para la medida de ecuol en muestra biológica mediante inmunoensayo, kit para la medida, y método para la determinación de la capacidad de un sujeto para producir ecuol**

30 Prioridad:

11.05.2009 JP 2009114572

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

10.03.2016

73 Titular/es:

**EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA (50.0%)
19-9 Taito 4-chome Taito-ku**

Tokyo 110-8408, JP y

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

MINEKAWA, TAKAYUKI;

SHINDOME, KUMIKO;

ABE, KATSUSHI;

OKUMA, HIROSHI;

ANDO, CHIEKO y

ABIRU, YASUHIRO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 563 049 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

Método para la medida de ecuol en muestra biológica mediante inmunoensayo, kit para la medida, y método para la determinación de la capacidad de un sujeto para producir ecuol

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un método para medir ecuol en una muestra biológica mediante un método inmunológico, a un kit para la medida, y a un método para determinar la capacidad de un sujeto para producir ecuol.

Técnica antecedente

- 10 Se sabe ampliamente que las isoflavonas contenidas en habas de soja tienen el efecto (el efecto antiestrogénico) de prevenir cáncer de mama, cáncer de próstata, y similar; así como el efecto (el efecto semejante a estrógeno) de aliviar los síntomas de la menopausia, enfermedades post-menopáusicas tales como osteoporosis, hiperlipidemia, hipertensión, y similares.

- 15 Además de los efectos clínicos directos de las isoflavonas de habas de soja, informes recientes sugieren que el ecuol, que es un metabolito activo de las isoflavonas de habas de soja, es la clave para la eficacia en aplicaciones clínicas, en lugar de las isoflavonas de habas de soja. Específicamente, diversos informes señalan que el ecuol es eficaz frente a cáncer de mama, cáncer de próstata, síntomas de la menopausia, y osteoporosis post-menopáusica.

Además, se ha dado a conocer que debido a que el ecuol es producido por bacterias intestinales, la cantidad de producción es diferente dependiendo de la flora intestinal, y de este modo varía entre diferentes individuos. En consecuencia, es innegable que hay algunos individuos que no pueden experimentar un efecto antiestrogénico deseado y un efecto semejante a estrógenos, incluso si ingieren productos procesados de habas de soja.

- 20 Cierta tiempo más tarde, se aislaron e identificaron bacterias de ácido láctico que producen eficientemente ecuol (bibliografía de patente 1). Se espera que se logre una ingesta eficiente de ecuol en el cuerpo al ingerir oralmente una preparación de bacterias de ácido láctico, y al permitir que las bacterias de ácido láctico alcancen o colonicen el intestino. En este momento, es posible confirmar si las bacterias de ácido láctico han alcanzado o colonizado el intestino midiendo ecuol, por ejemplo, en orina, sangre, heces, etc.

- 25 Los siguientes métodos son conocidos como métodos para medir ecuol: un método que usa un cromatógrafo de líquidos-espectrómetro de masas o un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas en el caso de muestras de sangre, y un método que usa análisis instrumental tal como cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC), etc., en el caso de muestras de orina. Sin embargo, se demanda un método de medida más simple.

- 30 Además, con respecto a los métodos para medir ecuol mediante inmunoensayo, existe comercialmente Labmaster TR-FIA Research Reagents for the Measurement of Equol, que usa fluoroinmunoensayo resuelto en el tiempo (NPL 1).

Mientras, se conoce la presencia de dos tipos de diastereoisómeros de ecuol, es decir, S-ecuol y R-ecuol. Entre ellos, S-ecuol es el único metabolito producido a través de daidzeína (un precursor de ecuol) por bacterias intestinales. Además, S-ecuol se une con un receptor de estrógenos de forma mucho más fuerte (NPL 2).

- 35 Específicamente, S-ecuol es el ecuol que indica su presencia *in vivo*, y que está contenido en muestras de sangre y muestras de orina; de este modo es útil para medir específicamente S-ecuol.

Lista de citas

Bibliografía de patente

[PTL 1] Publicación de Patente Japonesa Sin Examinar n° 2006-296434

- 40 Bibliografías no de patente

[NPL 1] E. Brouwers, et al. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2003, Vol. 84, p. 577-588

[NPL 2] K. D. R. Setchell, et al. The American Journal of Clinical Nutrition, 2005, Vol. 81, p. 1072-1079

Sumario de la invención

Problema técnico

- 45 Un objeto de la presente invención es desarrollar un método para medir específica y exactamente S-ecuol, en un método para medir ecuol mediante un método inmunológico, es decir, inmunoensayo. Otro objeto de la presente invención es desarrollar un kit capaz de medir específica y exactamente S-ecuol cuando se mide la concentración de ecuol mediante un método inmunológico. Todavía otro objeto de la presente invención es desarrollar un método para determinar la capacidad de un sujeto para producir ecuol.

Solución técnica

Los factores que afectan enormemente al comportamiento de un inmunoensayo incluyen la identidad o similitud entre una sustancia diana en una muestra y una sustancia patrón usada para determinar la concentración a partir de una reacción de la sustancia diana con su pareja de unión; o entre una sustancia diana en una muestra y una sustancia competitiva usada en una reacción de competición.

En consecuencia, se usó S-ecuol como sustancia patrón para preparar una curva patrón para obtener valores medidos. Como resultado, se mejoró la exactitud de los valores medidos.

Además, se usó S-ecuol marcado como un agente reaccionante competidor en un inmunoensayo que usa inmunorreacción competitiva. Como resultado, se suprimieron las reacciones no específicas, y se expandió el intervalo de medida exacta, en comparación a cuando se usó una mezcla de S-ecuol y R-ecuol.

La presente invención se logra como resultado de estudios adicionales basados en los hallazgos anteriores.

Específicamente, la presente invención comprende lo siguiente:

Apartado 1. Un método para medir ecuol en una muestra biológica mediante un método inmunológico, que comprende usar S-ecuol como al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón, y un antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra biológica.

Apartado 2. El método según el Apartado 1, que comprende usar, como anticuerpo primario, un anticuerpo anti-ecuol cuya reactividad cruzada con daidzeína es 10% o menos; la reactividad cruzada con genisteína es 10% o menos; la reactividad cruzada con gliciteína es 10% o menos; la reactividad cruzada con dihidrodaidzeína es 20% o menos; y la reactividad cruzada con deshidroecuol es 20% o menos, cuando la reactividad cruzada con S-ecuol se supone que es 100%.

Apartado 3. El método según el Apartado 1, en el que una sustancia marcadora en el antígeno marcado es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en enzimas, radioisótopos, colorantes, materiales fluorescentes, látex, y coloides metálicos.

Apartado 4. El método según el Apartado 1, en el que el método inmunológico es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en ELISA, radioinmunoensayo, y ensayo inmunocromatográfico.

Apartado 5. El método según el Apartado 1, en el que la muestra biológica es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en orina y sangre.

Apartado 6. El método según el Apartado 1, en el que un conjugado de ecuol en la muestra biológica se mide sin estar desconjugado.

Apartado 7. Un kit para medir ecuol en una muestra biológica mediante un método inmunológico, que comprende S-ecuol como al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón, y un antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra.

Apartado 8. El kit según el Apartado 7, que comprende además, como anticuerpo primario, un anticuerpo anti-ecuol cuya reactividad cruzada con daidzeína es 10% o menos; la reactividad cruzada con genisteína es 10% o menos; la reactividad cruzada con gliciteína es 10% o menos; la reactividad cruzada con dihidrodaidzeína es 20% o menos; y la reactividad cruzada con deshidroecuol es 20% o menos, cuando la reactividad cruzada con S-ecuol se supone que es 100%.

Apartado 9. El kit según el Apartado 7, en el que el método inmunológico es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en ELISA, radioinmunoensayo, y ensayo inmunocromatográfico.

Apartado 10. El kit según el Apartado 7, en el que la muestra biológica es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en orina y sangre.

Apartado 11. Un método para determinar la capacidad de un sujeto para producir ecuol, que comprende las etapas de

(1) medir ecuol en una muestra biológica derivada de un sujeto que ha ingerido isoflavona de haba de soja, mediante un método inmunológico que usa S-ecuol como al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón, y un antígeno marcado que compite con ecuol en la muestra biológica; y

(2) determinar la capacidad del sujeto para producir ecuol en base al valor medido de ecuol obtenido en la etapa (1).

Apartado 12. El método de determinación según el Apartado 11, en el que, en la etapa (1), un conjugado de ecuol en la muestra biológica se mide sin estar desconjugado.

Efectos ventajosos de la invención

- 5 Con la implementación del método de medida de la presente invención, es posible suprimir reacciones no específicas y obtener resultados de medida exactos en un método para medir ecuol en una muestra biológica mediante inmunoensayo. Adicionalmente, el método se puede implementar simplemente además con el uso del kit de la presente invención. Además, según el método de determinación de la presente invención se puede determinar de forma exacta y simple si un sujeto tiene una capacidad productora de ecuol.
- 10 Adicionalmente, la concentración de ecuol medida por la presente invención indica una elevada correlación con la concentración medida mediante HPLC. Además, la presente invención tarda solamente alrededor de 3 horas en detectar la concentración, y puede medir rápidamente la concentración de ecuol, en comparación con HPLC, que tarda 72 horas, o alrededor de 2 semanas en el caso de un trabajo de comisión. Adicionalmente, el kit de la presente invención cuesta mucho menos que la HPLC, aunque puede proporcionar el mismo nivel de sensibilidad de detección que la HPLC.
- 15 Además, según la presente invención, la presencia y el nivel de la capacidad de un sujeto para producir ecuol se puede determinar de forma exacta, simple y rápidamente con una elevada especificidad. Por lo tanto, en base a los resultados de medida y a los resultados de la determinación, es posible comprender el posible comienzo de enfermedades y el nivel de síntomas de las enfermedades (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de próstata, y síntomas de la menopausia; así como osteoporosis post-menopáusica, hiperlipidemia, hipertensión, etc.) asociadas con la falta de la capacidad productora de ecuol. En consecuencia, estas enfermedades se pueden prevenir y mejorar apropiadamente.
- 20

Breve descripción de los dibujos

- 25 [Fig. 1] La Fig. 1 es un diagrama de correlación que muestra los resultados medidos mediante HPLC y en el Ejemplo 1. En el diagrama, el eje vertical indica valores obtenidos mediante ELISA, y el eje horizontal indica valores obtenidos mediante HPLC. En cada caso, la unidad es ng/ml.
- [Fig. 2] La Fig. 2 es un diagrama de correlación de resultados medidos mediante HPLC y en el Ejemplo 2. En el diagrama, el eje vertical indica valores obtenidos mediante ELISA, y el eje horizontal indica valores obtenidos mediante HPLC. En cada caso, la unidad es ng/ml.
- 30 [Fig. 3] La Fig. 3 es un diagrama de correlación de resultados medidos mediante HPLC y en el Ejemplo 3. En el diagrama, el eje vertical indica valores obtenidos mediante ELISA, y el eje horizontal indica valores obtenidos mediante HPLC. En cada caso, la unidad es ng/ml.
- [Fig. 4] La Fig. 4 es un diagrama de correlación de resultados medidos mediante HPLC y en el Ejemplo Comparativo. En el diagrama, el eje vertical indica valores obtenidos mediante ELISA, y el eje horizontal indica valores obtenidos mediante HPLC. En cada caso, la unidad es ng/ml.
- 35 [Fig. 5] La Fig. 5 es un diagrama modelo de ELISA competitivo.
- [Fig. 6] La Fig. 6 es un diagrama de correlación de resultados en relación con la concentración de ecuol medida mediante LC/MS/MS, y mediante un inmunoensayo de la presente invención descrito en el Ejemplo de Ensayo 3.
- [Fig. 7] La Fig. 7 muestra la concentración de daidzeína en orina medida usando HPLC.
- 40 [Fig. 8] La Fig. 8 muestra gráficas de EQL ELISA frente a Log de la relación E/D.

Descripción de realizaciones

La presente invención se describe a continuación.

1. Método para medir ecuol en muestra biológica mediante método inmunológico

- 45 El método de la presente invención para medir ecuol en una muestra biológica mediante un método inmunológico (en lo sucesivo denominado algunas veces aquí como "inmunoensayo") comprende el uso de S-ecuol como al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón, y un antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra biológica. El inmunoensayo de la presente invención se describe más abajo.

Antígeno inmunizante para preparar anticuerpo frente a S-ecuol

El ecuol, es decir, la sustancia diana de la presente invención, es un hapteno de bajo peso molecular. Por lo tanto, el ecuol por sí mismo no posee inmunogenicidad. En consecuencia, a fin de obtener un anticuerpo usado para inmunoensayo, es preferible preparar un antígeno inmunizante sintetizando un complejo en el que el ecuol esté unido a un portador antigénico.

- 5 Aunque el portador antigénico no está limitado a ningún tipo en tanto que se pueda preparar el antígeno inmunizante, es preferible un material polimérico (que tenga un peso molecular de 10.000 o más, preferiblemente 50.000 a 1.000.000), siendo particularmente preferible una proteína. Ejemplos preferibles de proteínas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, seroalbúmina bovina (BSA), caseína, gelatina, ferritina, etc.

- 10 Además, el método para unir el hapteno al portador antigénico no está limitado, en tanto que el hapteno y el portador antigénico se puedan unir juntos. Un método preferible es un enlace covalente.

- 15 En el caso de un enlace covalente, por ejemplo cuando se usa una proteína como portador antigénico, un grupo succinimida que se ha introducido en el hapteno se hace reaccionar con la proteína o un grupo amino de la glicoproteína mediante el método de éster activado por N-hidroxisuccinimida; y el hapteno se puede unir de ese modo al portador antigénico. En este caso, como otros métodos, se ejemplifica el método de dialdehído glutárico, y similar.

Además, en el enlace entre el hapteno y el portador antigénico, se introduce un compuesto espaciador en el hapteno antes de enlazar el hapteno al portador antigénico, a fin de expandir la distancia entre el hapteno y el portador antigénico. De esta manera, es posible alterar la afinidad por el anticuerpo, y la especificidad del anticuerpo.

- 20 Se puede usar cualquier compuesto espaciador en tanto que el hapteno y el portador antigénico se puedan unir vía el compuesto espaciador, y la afinidad por el anticuerpo y la especificidad del anticuerpo se puedan alterar mediante el compuesto espaciador. Sus ejemplos incluyen éter carboximetílico (CME), éter carboxipropílico (CPE), éter carboxibutílico (CBE), éter carboxifenílico (CPhE), y similares, siendo preferible CME.

- 25 Los ejemplos de uniones entre el hapteno y el portador antigénico vía un compuesto espaciador incluyen ecuol-CME-proteína descrita más tarde, ecuol-CPE-proteína, ecuol-CBE-proteína, ecuol-CPhE-proteína, y similares. La ecuol-CME-proteína se prepara de la manera descrita en un Ejemplo descrito más tarde. Otros agentes inmunizantes que tienen un compuesto espaciador se pueden preparar adecuadamente por una persona experta en la técnica según el tipo de compuesto espaciador usado.

Hapteno marcado

- 30 Un hapteno marcado para detectar la presencia de un anticuerpo se puede preparar de la misma manera descrita anteriormente, usando una sustancia marcadora en lugar del portador antigénico. La afinidad por el anticuerpo a detectar se puede ajustar introduciendo un compuesto espaciador entre el hapteno y la sustancia marcadora.

- 35 Como sustancia marcadora se puede usar cualquier sustancia marcadora conocida, en tanto que no inhiba una reacción antígeno-anticuerpo. Los ejemplos de sustancias marcadoras incluyen enzimas, radioisótopos, colorantes, materiales fluorescentes, látex, coloides metálicos, europio, acridinio, y similares. Una sustancia marcadora preferible se selecciona del grupo que consiste en enzimas, radioisótopos, colorantes, materiales fluorescentes, látex, y coloides metálicos. Además, los ejemplos de enzimas incluyen peroxidasas, fosfatasa alcalina, luciferasa, y similares; los ejemplos de radioisótopos incluyen ¹²⁵I y similares; los ejemplos de colorantes incluyen colorantes a base de cianina y similares; los ejemplos de materiales fluorescentes incluyen FITC, cy3, cy5, y similares; los ejemplos de látex incluyen látex de poliestireno, látex magnéticos, y similares; y los ejemplos de coloides metálicos incluyen oro, plata, platino, y similares. De estas sustancias marcadoras, los ejemplos preferibles incluyen enzimas; ejemplos preferibles adicionales incluyen peroxidasas; y ejemplos particularmente preferibles incluyen peroxidasa de rábano picante, debido a la ventaja de que pueden simplificar una detección muy sensible.

- 45 Además, ejemplos de compuestos espaciadores usados para unir el hapteno a la sustancia marcadora incluyen éter carboximetílico (CME), éter carboxipropílico (CPE), éter carboxibutílico (CBE), éter carboxifenílico (CPhE), y similares, siendo preferible CPE.

Anticuerpo: Anticuerpo primario

- 50 El anticuerpo primario usado en la presente invención no está limitado a ningún tipo en tanto que se pueda unir específicamente a ecuol. Se pueden usar anticuerpos policlonales o monoclonales. Además, como anticuerpo primario se puede usar un fragmento del anticuerpo, en tanto que mantenga la especificidad por el ecuol. Adicionalmente, como anticuerpo primario también se puede usar un antisuero.

El anticuerpo primario usado para inmunoensayo se puede preparar llevando a cabo un método conocido. Por ejemplo, el anticuerpo primario se puede preparar mediante el método descrito más abajo; sin embargo, el método de preparación no está limitado al siguiente ejemplo.

Específicamente, un anticuerpo policlonal se puede preparar de la siguiente manera: un antígeno inmunizante en el que el ecuol está unido a un portador antigénico se mezcla con adyuvante completo de Freund para preparar un agente inmunizante; el agente inmunizante preparado se inyecta con frecuencia subcutánea y/o intradérmicamente varias veces en animales tales como conejos, cabras, caballos, ovejas, cobayas, pollos, etc., obteniendo de ese modo un antisuero; y el antisuero se purifica, se diluye, o similar. Los ejemplos de agentes inmunizantes incluyen aquellos descritos anteriormente; y el uso de un adyuvante es deseable, aunque no esencial. El antisuero se puede recoger según un método conocido con anterioridad para la preparación. El anticuerpo primario usado en la presente invención es preferiblemente un antisuero de conejo.

Un anticuerpo monoclonal se puede preparar de la siguiente manera: un antígeno inmunizante en el que ecuol está unido a un portador antigénico se mezcla con adyuvante completo de Freund para preparar un agente inmunizante; el agente inmunizante preparado se inyecta con frecuencia subcutánea y/o intradérmicamente varias veces en animales tales como ratones, ratas, etc.; el antígeno inmunizante solo se inyecta entonces intravenosamente o intraperitonealmente; las células del bazo preparadas a partir del bazo extirpado varios días más tarde se fusionan con células de mieloma; y las células fusionadas se cultivan selectivamente.

Las células fusionadas que se han hecho crecer se cultivan para producir clones, y se selecciona una estirpe celular que produce anticuerpos IgG que se unen específicamente a ecuol. El sobrenadante de cultivo obtenido mediante cultivo de la estirpe celular seleccionada se purifica, se diluye, o similar. De ese modo, se puede preparar un anticuerpo monoclonal para ser usado para la medida. Como en el caso de un anticuerpo policlonal, los ejemplos de agentes inmunizantes incluyen los descritos anteriormente; y el uso de un adyuvante es deseable, aunque no esencial.

El anticuerpo primario usado en la presente invención tiene deseablemente una elevada especificidad por S-ecuol, y una baja reactividad cruzada con otras isoflavonas que tienen una estructura similar. En particular, debido a que daidzeína, dihidrodaidzeína, y deshidroecuol son factores que conducen a detección errónea de ecuol en una muestra biológica, es deseable usar un anticuerpo primario que tenga una baja reactividad cruzada con estos compuestos. Específicamente, cuando la reactividad cruzada del anticuerpo primario usado en la presente invención con S-ecuol se supone que es 100%, su reactividad cruzada con daidzeína, genisteína, gliciteína, dihidrodaidzeína, y deshidroecuol cae de forma deseable en los siguientes intervalos:

la reactividad cruzada con daidzeína: 10% o menos, preferiblemente 1% o menos, además preferiblemente 0,1% o menos;

la reactividad cruzada con genisteína: 10% o menos, preferiblemente 1% o menos, además preferiblemente 0,1% o menos;

la reactividad cruzada con gliciteína: 10% o menos, preferiblemente 1% o menos, además preferiblemente 0,1% o menos;

la reactividad cruzada con dihidrodaidzeína: 20% o menos, preferiblemente 5% o menos, además preferiblemente 1,1% o menos; y

la reactividad cruzada con deshidroecuol: 20% o menos, preferiblemente 5% o menos, además preferiblemente 1% o menos.

La reactividad cruzada anterior se puede explicar según lo siguiente. Específicamente, la reactividad cruzada anterior indica una relación (%) de la concentración (IC_{20}) de S-ecuol no marcado a la que la reacción de unión de S-ecuol marcado al anticuerpo anti-ecuol puede ser inhibida en un 20%, a la concentración (IC_{20}) de cada isoflavona y similar a la que la reacción de unión de S-ecuol marcado al anticuerpo anti-ecuol puede ser inhibida en un 20%. Más específicamente, en la reacción competitiva entre S-ecuol marcado y S-ecuol no marcado, se determina la concentración de S-ecuol no marcado a la que la unión de S-ecuol marcado al anticuerpo es 80, suponiendo que la unión de S-ecuol marcado solo al anticuerpo es 100. De forma similar, cada isoflavona no marcada y similar se hace reaccionar competitivamente con S-ecuol marcado, y se determina la concentración de cada isoflavona y similar a la que la unión de S-ecuol marcado al anticuerpo es 80.

La relación así determinada (expresada en porcentaje) entre la concentración (IC_{20}) del S-ecuol no marcado y la concentración (IC_{20}) de cada isoflavona y similar se denomina como la reactividad cruzada. Esta se representa mediante la siguiente fórmula:

Reactividad cruzada (%) = (IC_{20} de S-ecuol/ IC_{20} de cada isoflavona, etc.) x 100

Aquí, la tasa de reactividad cruzada se determina mediante ELISA competitivo, usando S-ecuol como el antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón, así como el antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra biológica.

Además, la concentración de S-ecuol marcado usada para la determinación de la tasa de reactividad cruzada se puede ajustar adecuadamente a las condiciones en las que el antígeno se puede medir con sensibilidad elevada

mediante ELISA competitivo. Los ejemplos de sustancias marcadoras incluyen las enzimas mencionadas anteriormente.

Más específicamente, por ejemplo, la tasa de reactividad cruzada se determina según el mismo procedimiento como en el Ejemplo de Ensayo 2 descrito más tarde.

- 5 Es posible detectar ecuol en una muestra biológica con mayor sensibilidad usando un anticuerpo primario que tiene la especificidad descrita anteriormente, y usando S-ecuol como el antígeno patrón y/o el antígeno marcado que compite con ecuol en la muestra biológica.

Anticuerpo: Anticuerpo secundario

- 10 Un anticuerpo secundario usado en la presente invención es un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario se puede preparar según un método conocido.

Cuando se usa un anticuerpo de conejo o un antisuero de conejo como el anticuerpo primario, preferiblemente se puede usar un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo como el anticuerpo secundario.

Además, se puede usar la unión de biotina-avidina/estreptavidina. En este caso, por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo primario biotinilado para que una la biotina a avidina/estreptavidina inmovilizada sobre una fase sólida.

- 15 Antígeno patrón, y antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra biológica

Además, en la presente invención, cuando se mide ecuol en la muestra biológica usando un anticuerpo preparado mediante el método descrito anteriormente, es posible obtener un valor medido exacto usando S-ecuol como el antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón y/o el antígeno marcado que compite con ecuol en la muestra. Específicamente, aunque S-ecuol se usa en la presente invención como al menos uno del antígeno patrón
20 usado para la preparación de una curva patrón y el antígeno marcado que compite con ecuol en la muestra, es deseable usar S-ecuol tanto como el antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón como el antígeno marcado que compite con ecuol en la muestra, en vistas a incrementar la exactitud de la medida de ecuol en una muestra biológica.

- 25 Como sustancia marcadora en el antígeno marcado anterior, se puede usar cualquier sustancia marcadora conocida hasta ahora, en tanto que no inhiba una reacción antígeno-anticuerpo. Los ejemplos de sustancias marcadoras incluyen enzimas, radioisótopos, colorantes, materiales fluorescentes, látex, coloides metálicos, europio, acridinio, y similares. Una sustancia marcadora preferible se selecciona del grupo que consiste en enzimas, radioisótopos, colorantes, materiales fluorescentes, látex, y coloides metálicos. Además, los ejemplos de enzimas incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina, luciferasa, y similares; los ejemplos de radioisótopos incluyen ¹²⁵I y similares; los
30 ejemplos de colorantes incluyen colorantes a base de cianina y similares; los ejemplos de materiales fluorescentes incluyen FITC, cy3, cy5, y similares; los ejemplos de látex incluyen látex de poliestireno, látex magnéticos, y similares; y los ejemplos de coloides metálicos incluyen oro, plata, platino, y similares. De estas sustancias marcadoras, los ejemplos preferibles incluyen enzimas, ejemplos preferibles adicionales incluyen peroxidasa, y ejemplos particularmente preferibles incluyen peroxidasa de rábano picante, debido a que pueden simplificar
35 ventajosamente una detección muy sensible.

- Con el fin de unir el antígeno a la sustancia marcadora, y ajustar la afinidad y similar entre el antígeno y el anticuerpo, se puede introducir un compuesto espaciador entre el antígeno y la sustancia marcadora. Ejemplos de compuestos espaciadores usados para unir el antígeno (S-ecuol) a la sustancia marcadora incluyen éter carboximetílico (CME), éter carboxipropílico (CPE), éter carboxibutílico (CBE), éter carboxifenílico (CPhE), y
40 similares, siendo preferible CPE.

Muestra biológica

- La muestra biológica para la medida de ecuol no está particularmente limitada a ningún tipo, en tanto que sea una muestra que deriva de organismos vivos, incluyendo animales y plantas, y a partir de la que se puede medir ecuol. Sus ejemplos incluyen orina, sangre (por ejemplo, suero y plasma sanguíneo), heces, extractos tisulares, extractos
45 celulares, materias alimentarias, etc. Las muestras biológicas derivan preferiblemente de un ser humano; y son preferiblemente además orina y sangre, y particularmente de forma preferible derivan de orina de un ser humano.

Además, la muestra biológica usada para la medida de ecuol se puede diluir, si es necesario.

Enzima de pretratamiento (desconjugación) de muestra biológica

- El ecuol contenido en la muestra biológica está presente habitualmente en forma de conjugado. En consecuencia, la
50 muestra biológica se puede someter a un pretratamiento para la desconjugación del ecuol antes de ser usada en una reacción de antígeno-anticuerpo.

El procedimiento de desconjugación se puede llevar a cabo usando enzimas tales como β -glucuronidasa (que contiene glucuronidasa y sulfatasa), glucuronidasa, sulfatasa, etc. Más específicamente, los ejemplos preferibles de

disoluciones enzimáticas usadas para el procedimiento de desconjugación incluyen una composición que comprende principalmente 6% de β -glutafasa y tampón de ácido acético 0,1 M (pH 5,5).

- Además, el procedimiento de desconjugación se puede llevar a cabo antes de o simultáneamente con la reacción de antígeno-anticuerpo. Aunque las condiciones de reacción del procedimiento de desconjugación se ajustan adecuadamente según los tipos de la enzima, la muestra biológica usada, y similar, el procedimiento de desconjugación se lleva a cabo habitualmente a 25°C hasta 56°C durante 5 minutos hasta 24 horas.

Diluyente para muestra biológica y/o antígeno patrón

- Un diluyente usado para dilución de la muestra biológica y del antígeno patrón no está limitado a ningún tipo, en tanto que no afecte de forma adversa a la medida. Se puede usar un diluyente usado en un método inmunológico general. Los ejemplos preferibles de diluyentes usados en la presente invención incluyen una disolución mixta de cloruro sódico y tampón de fosfato (pH 7,5) que contiene seroalbúmina bovina, 100% de suero humano tratado con carbón, etc. Ejemplos más específicos de diluyentes incluyen una disolución mixta de cloruro sódico 150 mM y tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,5) que contiene 1,0% de seroalbúmina bovina.

Método inmunológico para medir la concentración de ecuol

- Seguidamente, se describen a continuación ejemplos específicos de métodos inmunológicos para medir ecuol. Sin embargo, la naturaleza de la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

- En la presente invención, un método inmunológico para medir ecuol no está limitado a ningún tipo, en tanto que pueda medir la concentración de ecuol en una muestra biológica mediante una reacción de antígeno-anticuerpo en la que se usan el antígeno y el anticuerpo. Sus ejemplos incluyen ELISA, radioinmunoensayo, ensayo inmunocromatográfico, etc.

Cuando se usa ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzima) como el método inmunológico, el ecuol en una muestra biológica se puede medir según una técnica de ELISA conocida hasta ahora, que puede ser cualquiera de ELISA competitivo, ELISA de sándwich, y ELISA directo. Como tipo de ELISA, se prefiere el ELISA competitivo. Como referencia, en la Fig. 5 se muestra un modelo de ELISA competitivo.

- Por ejemplo, cuando se usa ELISA competitivo, la medida de ecuol en una muestra biológica mediante ELISA se lleva a cabo, por ejemplo, según lo siguiente: una muestra biológica, un antígeno marcado con enzima (antígeno marcado), y un anticuerpo primario se añaden a pocillos de una microplaca a la que previamente se ha inmovilizado un anticuerpo secundario, y la reacción se lleva a cabo para formar un complejo de anticuerpo secundario-anticuerpo primario-ecuol. El anticuerpo primario se puede añadir simultánea o separadamente a la muestra biológica y al antígeno marcado. Tras la reacción, los pocillos se lavan con una disolución de lavado, y se añade un sustrato para la enzima para la reacción. Subsiguientemente, la reacción se detiene mediante una disolución de parada de la reacción, o similar, y se mide la absorbancia. Después, la concentración de ecuol en la muestra se calcula a partir de una curva patrón generada midiendo el antígeno patrón de la misma manera.

- En este caso, se puede usar una microplaca conocida hasta ahora, y el tamaño y la forma de los pocillos no están limitados en tanto que se pueda llevar a cabo la reacción anterior. Además, el anticuerpo secundario se puede inmovilizar sobre los pocillos mediante un método conocido hasta ahora. De forma similar, como sustrato, se puede usar un sustrato conocido hasta ahora que sea adecuado para la enzima.

- Además, en el ensayo de ELISA competitivo, las cantidades añadidas de anticuerpo primario, anticuerpo secundario y antígeno marcado no están limitadas, en tanto que el ecuol en la muestra biológica se pueda medir de forma exacta mediante el método pertinente; y se ajustan de forma adecuada según las condiciones generales del ELISA. Adicionalmente, en el caso de un método inmunológico distinto de ELISA, las cantidades añadidas de anticuerpo primario, anticuerpo secundario y antígeno marcado se ajustan adecuadamente de forma similar según condiciones conocidas hasta ahora.

- Cada reacción en el ELISA se puede llevar a cabo según condiciones conocidas hasta ahora, y se ajusta adecuadamente según el tipo de muestras biológicas y el método de ELISA. Por ejemplo, en el caso de ELISA competitivo, habitualmente se lleva a cabo una reacción de antígeno-anticuerpo a 4°C hasta 37°C durante 5 minutos hasta 24 horas para formar un complejo de anticuerpo secundario-anticuerpo primario-ecuol.

- Más específicamente, para la medida de ecuol en orina mediante ELISA (ELISA competitivo), se añade un diluyente a una muestra de orina para preparar una muestra de orina diluida; la muestra de orina diluida preparada, ecuol marcado con peroxidasa de rábano picante, y antisuero de conejo anti-ecuol diluido (anticuerpo primario) se añaden a los pocillos de una microplaca a la que se ha inmovilizado previamente un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (anticuerpo secundario); y la reacción se lleva a cabo durante un cierto período de tiempo. Tras la reacción, los pocillos se lavan, y se añade una disolución de sustrato colorimétrico para permitir la reacción durante un cierto período de tiempo. Después del cierto período de tiempo, la reacción se detiene, y se mide la absorbancia. Después, la concentración de ecuol en la muestra se calcula a partir de una curva patrón generada midiendo el antígeno patrón de la misma manera.

El tampón (tampón de dilución del antisuero) para diluir antisueros no está limitado a ningún tipo, en tanto que pueda diluir adecuadamente los antisueros y no afecte de forma adversa a la medida. Ejemplos preferibles de tampones de dilución del antisuero usados en la presente invención incluyen una disolución mixta que contiene cloruro de sodio, seroalbúmina bovina, tampón de fosfato (pH 7,5) que contiene Tween 20, etc. Más específicamente, ejemplos de tampones de dilución del antisuero incluyen una disolución mixta de cloruro de sodio 150 mM, 0,5% de seroalbúmina bovina, y 0,01% de tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,5) que contiene Tween 20. El tampón de dilución del antisuero puede usarse no solamente en ELISA competitivo, sino también en diferentes tipos de ELISA distintos de ELISA competitivo, así como en diversos métodos inmunológicos. Obsérvese que Tween es una marca registrada.

La medida de ecuol en una muestra biológica mediante RIA (radioinmunoensayo) también se puede llevar a cabo según un método conocido hasta ahora. La medida se puede llevar a cabo de la misma manera que en ELISA, excepto que se usa como sustancia marcadora un radioisótopo. Lo siguiente es un ejemplo de RIA en el que se usa orina como la muestra biológica y se usa ^{125}I como el radioisótopo.

Un diluyente se añade a una muestra de orina para preparar una muestra de orina diluida; la muestra de orina diluida preparada, S-ecuol marcado con ^{125}I , y el sobrenadante de cultivo celular productor de anticuerpo anti-ecuol diluido se añaden a los pocillos de una microplaca a los que se ha inmovilizado previamente un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo; y la reacción se lleva a cabo durante un cierto período de tiempo. Tras la reacción, los pocillos se lavan; se mide la radioactividad en los pocillos de la microplaca; y la concentración de ecuol en la muestra se calcula a partir de una curva patrón generada midiendo el antígeno patrón de la misma manera.

La medida de ecuol en una muestra biológica mediante un ensayo inmunocromatográfico (inmunocromatografía) también se puede llevar a cabo según un procedimiento conocido hasta ahora. Lo siguiente es una técnica ejemplar de un ensayo inmunocromatográfico en el que se usa orina como la muestra biológica y se usa coloide de oro como el radioisótopo. Específicamente, se añade un anticuerpo monoclonal de ratón anti-ecuol marcado con coloide de oro a una muestra de orina para preparar una muestra de orina diluida, y la muestra de orina diluida se añade gota a gota a una almohadilla de muestras de una tira inmunocromatográfica para permitir la reacción durante un cierto período de tiempo. Tras la reacción, se mide la coloración causada por la sustancia marcadora de coloide de oro en un área de captura sobre la que se inmoviliza ecuol, y la concentración de ecuol en la muestra se calcula a partir de una curva patrón generada midiendo el antígeno patrón de la misma manera.

Además, un método para medir ecuol en una muestra biológica usando un anticuerpo marcado es como sigue: ecuol o su análogo unido a un portador antigénico se inmoviliza a una fase sólida, y se mezcla con un anticuerpo policlonal de conejo anti-ecuol marcado con un material fluorescente y con una muestra biológica; el material fluorescente que compite de ese modo con la sustancia diana en la muestra biológica y está unido a la fase sólida se lava; la medida se lleva a cabo subsiguientemente; y se calcula la concentración de ecuol en la muestra a partir de una curva patrón generada midiendo el antígeno patrón de la misma manera.

Además, el ELISA de sándwich abierto es conocido como método para medir ecuol en una muestra biológica usando un fragmento de anticuerpo marcado. En este método de medida, el ecuol en una muestra se puede medir, por ejemplo, usando un fragmento de unión a antígeno de cadena ligera y un fragmento de unión a antígeno de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-ecuol; y formando un polímero en el que se inserta ecuol en la muestra biológica.

Específicamente, el fragmento de unión a antígeno de cadena ligera se inmoviliza sobre una fase sólida, y se mezcla con un fragmento de unión a antígeno de cadena pesada marcado con fosfatasa alcalina y con una muestra biológica; tras lavar, se mide la actividad de fosfatasa alcalina que está unida a la fase sólida vía ecuol en la muestra biológica; y se calcula la concentración de ecuol en la muestra a partir de una curva patrón generada midiendo el antígeno patrón de la misma manera.

Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de cadena ligera y el fragmento de unión a antígeno de cadena pesada se pueden marcar con diferentes materiales fluorescentes para medir el fenómeno de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia causado por la formación de un complejo vía ecuol en una muestra biológica; y la concentración de ecuol en la muestra se puede calcular a partir de una curva patrón generada midiendo el antígeno patrón de la misma manera.

Una realización preferible de la presente invención es ELISA como el método inmunológico; una realización preferible adicional de la misma es ELISA competitivo; y una realización particularmente preferible de la misma es ELISA competitivo que usa S-ecuol tanto como antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón como antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra.

2. Kit para medir la concentración de ecuol en una muestra biológica mediante método inmunológico

El kit de la presente invención para medir la concentración de ecuol en una muestra biológica mediante un método inmunológico se caracteriza por que el kit incluye S-ecuol como al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón, y un antígeno marcado que compite con ecuol en la muestra. El kit de la presente invención puede incluir además un anticuerpo primario que se une específicamente a S-ecuol.

Además, el kit de la presente invención puede incluir, si es necesario, al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en un diluyente para una muestra biológica y/o antígeno patrón, una disolución enzimática para desconjugación de un conjugado de S-ecuol en la muestra, una placa a la que se inmoviliza un anticuerpo secundario, y una disolución de lavado.

5 El kit de la presente invención puede incluir además un reactivo requerido adicionalmente según el tipo del método inmunológico empleado. Por ejemplo, cuando el kit se usa en ELISA competitivo, el kit puede incluir además al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en un sustrato para una sustancia marcadora en el antígeno marcado, una disolución de parada de la reacción para detener la reacción entre la sustancia marcadora y el sustrato, y un disolvente para disolver el sustrato.

10 Además, cuando se usan antisueros en el kit de la presente invención, el kit puede incluir un tampón de dilución del antisuero a usar para diluir los antisueros.

Cada reactivo que se puede incluir en el kit de la presente invención se describe más abajo.

Antígeno patrón

15 Se puede usar de forma similar el antígeno patrón descrito anteriormente. El antígeno patrón puede estar incluido en forma de una disolución en el kit. Por ejemplo, cuando se usa S-ecuol como antígeno patrón, S-ecuol puede estar en forma de una disolución patrón de ecuol que contiene S-ecuol, cloruro de sodio, y tampón de fosfato (pH 7,5) que contiene seroalbúmina bovina. Los ejemplos de disoluciones patrón de ecuol incluyen una mezcla que contiene 810 ng/ml de S-ecuol, cloruro de sodio 150 mM, y tampón de fosfato 0,01 M (pH 7,5) que contiene 0,1% de seroalbúmina bovina. Además, ejemplos de diferentes tipos de disoluciones patrón de ecuol incluyen una disolución mixta de S-ecuol y suero humano tratado con carbón al 100%, y similares.

Antígeno marcado

Se puede usar de forma similar el antígeno marcado descrito anteriormente. Un ejemplo preferible es S-ecuol marcado con peroxidasa, y un ejemplo particularmente preferible es S-ecuol marcado con peroxidasa de rábano picante.

25 Sustrato para sustancia marcadora

Como sustrato para la sustancia marcadora se puede usar una sustancia conocida hasta ahora, y la sustancia se usa en combinación con una sustancia marcadora conocida hasta ahora. Por ejemplo, en el caso de peroxidasa de rábano picante, los ejemplos del sustrato incluyen peróxido de hidrógeno. El sustrato se usa preferiblemente después de ser disuelto en el disolvente mencionado más tarde.

30 Disolvente

Si es necesario, se usa un disolvente a fin de disolver la sustancia. Como disolvente se puede usar cualquier tampón conocido hasta ahora, en tanto que pueda disolver de forma adecuada la sustancia y no afecte de forma adversa a la medida. Sus ejemplos incluyen un tampón de citrato, un tampón de ácido acético, y similares. El disolvente se puede proporcionar en una forma que contiene el sustrato previamente.

35 Cuando el sustrato es el peróxido de hidrógeno descrito anteriormente, se usa como disolución del sustrato una disolución obtenida disolviendo OPD (dihidrocloreto de o-fenilendiamina) en el disolvente. Una realización adecuada es una disolución de sustrato que contiene disolución de peróxido de hidrógeno al 0,05% y tampón de citrato 50 mM (pH 5,5) que contiene 2,2 mg/ml de OPD (dihidrocloreto de o-fenilendiamina).

Anticuerpo: Anticuerpo primario

40 De forma similar se puede usar el anticuerpo primario descrito anteriormente. Preferiblemente, se usa un antisuero; y más preferiblemente, se usa un antisuero de conejo. El antisuero se usa tras ser diluido con el tampón de disolución del antisuero descrito más tarde, si es necesario. El antisuero puede incluirse en el kit en el estado diluido con el tampón de dilución del antisuero.

Anticuerpo: anticuerpo secundario

45 De forma similar, se puede usar el anticuerpo secundario descrito anteriormente. Cuando se usa un anticuerpo de conejo o un antisuero de conejo como anticuerpo primario, preferiblemente se usa como anticuerpo secundario un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo. Además, cuando se emplea ELISA competitivo, el anticuerpo secundario se inmoviliza preferiblemente a pocillos de una placa. Como microplaca se puede usar una microplaca conocida hasta ahora, y la inmovilización se puede llevar a cabo según un método conocido hasta ahora.

50 Tampón de dilución del antisuero

El tampón de dilución del antisuero se usa a fin de diluir el antisuero descrito anteriormente, si es necesario. El tampón de dilución del antisuero no está limitado a ningún tipo, en tanto que pueda diluir adecuadamente el antisuero y no afecte de forma adversa a la medida. De forma similar, se puede usar la dilución del antisuero descrita anteriormente. El tampón de dilución del antisuero puede estar incluido en el kit en el estado en el que el antisuero está diluido.

5

Disolución enzimática para pretratamiento (desconjugación) de muestra biológica

De forma similar, la disolución enzimática descrita anteriormente se puede usar para el pretratamiento (desconjugación) de la muestra biológica.

Diluyente para muestra biológica y/o antígeno patrón

10 De forma similar, se puede usar el diluyente descrito anteriormente, que se usa para la muestra biológica y el antígeno patrón.

Disolución de parada de la reacción para detener la reacción entre la sustancia marcadora y el sustrato

La disolución de parada de la reacción para detener la reacción entre la sustancia marcadora y el sustrato no está limitada a ningún tipo, en tanto que pueda detener la reacción entre ellos y no afecte a los resultados de la medida. Se puede usar una disolución de parada de la reacción conocida hasta ahora. Los ejemplos de disoluciones de parada de la reacción incluyen ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, etc.

15

Disolución de lavado

La disolución de lavado se usa para eliminar muestras biológicas en exceso, anticuerpos, etc., de los pocillos o similares, después de que la reacción de antígeno-anticuerpo ha terminado, y antes de que se dispense el sustrato. La disolución de lavado no está limitada a ningún tipo, en tanto que pueda lavar adecuadamente y no afecte de forma adversa a la medida. Se puede usar una disolución de lavado conocida hasta ahora como tal, o diluyéndola con agua pura o similar. Los ejemplos de disoluciones de lavado incluyen agua pura, disoluciones en las que un tensioactivo se diluye con un tampón, y similares.

20

Adicionalmente, el kit de la presente invención también puede incluir un manual que describe protocolos para usar el kit, una placa para dilución, una cinta para cerrar herméticamente la placa, y similar. Además, se puede añadir un colorante para coloración a la disolución descrita anteriormente incluida en el kit.

25

Los ejemplos de muestras biológicas a determinar mediante el kit de la presente invención incluyen los descritos anteriormente. Además, los ejemplos de métodos inmunológicos llevados a cabo usando el kit también incluyen los métodos descritos anteriormente, siendo preferible ELISA, y siendo particularmente preferible ELISA competitivo.

30

Las cantidades del anticuerpo, antígeno, disolución, y similares, contenidos en el kit no están limitadas en tanto que se pueda medir la concentración de ecuol en una muestra biológica. Como se describe anteriormente, las cantidades se ajustan adecuadamente según las condiciones generales de ELISA y otros métodos inmunológicos.

3. Método para determinar la capacidad de un sujeto para producir ecuol

El método de la presente invención para determinar la capacidad de un sujeto para producir ecuol (aquí en lo sucesivo, denominado algunas veces como "método de determinación") comprende las etapas de (1) medir ecuol en una muestra biológica derivada de un sujeto que ingirió isoflavona de haba de soja, mediante un método inmunológico que usa S-ecuol como al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón y un antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra biológica, y (2) determinar la capacidad del sujeto para producir ecuol en base al valor medido de ecuol, que se obtiene en la Etapa (1). A continuación se describe cada etapa del método de determinación de la presente invención.

35

40

Etapa (1)

En la Etapa (1), el ecuol en una muestra biológica derivada de un sujeto que ingirió isoflavona de haba de soja se mide mediante un método inmunológico usando S-ecuol como al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón, y un antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra biológica.

45

La muestra biológica usada en la Etapa (1) es una muestra biológica derivada de un sujeto que ingirió isoflavona de haba de soja. El ecuol es un metabolito activo de isoflavona de haba de soja. Por lo tanto, en el caso de un sujeto que no ha ingerido isoflavona de haba de soja, no se detectará ecuol; o el valor medido de ecuol será muy bajo, independientemente de la presencia de la capacidad del sujeto para producir ecuol. En consecuencia, es necesario que el sujeto ingiera previamente isoflavona de haba de soja. La cantidad de isoflavona de haba de soja a ingerir por el sujeto no está particularmente limitada. La cantidad total de isoflavona de haba de soja es, por ejemplo, 20 a 70 mg, preferiblemente alrededor de 25 a 50 mg. Además, el período de tiempo en el que se ingiere la isoflavona de

50

haba de soja no está limitado particularmente tampoco. Por ejemplo, la isoflavona de haba de soja se ingiere todos los días durante 3 días antes de recoger muestras biológicas, o 6 a 24 horas antes de recoger muestras biológicas, preferiblemente 8 a 12 horas antes de recoger muestras biológicas. La isoflavona de haba de soja utilizable a ingerir por el sujeto está en forma de productos de haba de soja tales como leche de soja, comprimidos de isoflavona de haba de soja, barritas de haba de soja, pasta de haba de soja fermentada, cuajada de haba de soja, habas de soja cocidas, habas de soja verdes, habas negras, tempeh, etc.

La muestra biológica usada en la Etapa (1) puede ser cualquiera de orina, sangre (suero, plasma sanguíneo), heces, y similar, siendo preferibles orina y sangre, y siendo más preferible orina.

La medida de ecuol mediante el método inmunológico en la Etapa (1) se lleva a cabo según la sección descrita anteriormente titulada "1. Método para medir ecuol en muestra biológica mediante método inmunológico".

Etapa (2)

En la Etapa 2, la capacidad de un sujeto para producir ecuol se determina en base al valor medido de ecuol, que se obtiene en la Etapa (1).

En la Etapa (2), se determina que un sujeto en el que se detecta ecuol en su muestra biológica en la Etapa (1) tiene la capacidad para producir ecuol, y se determina que un sujeto en el que ecuol no se detecta en su muestra biológica en la Etapa (1) no tiene la capacidad para producir ecuol.

Obsérvese que, en la Etapa (2), es preferible determinar si la concentración medida de ecuol es menor que un valor de corte a fin de suprimir la determinación errónea cuando se determina la presencia de la capacidad productora de ecuol. Específicamente, cuando la concentración medida de ecuol en una muestra biológica es menor que el valor de corte, se determina que un sujeto de la muestra biológica no tiene la capacidad para producir ecuol; y cuando la concentración medida de ecuol en una muestra biológica es igual o mayor que el valor de corte, se determina que un sujeto de la muestra biológica tiene la capacidad para producir ecuol. El valor de corte se puede establecer según lo siguiente:

1. La concentración de ecuol en una muestra biológica se mide mediante el método inmunológico descrito anteriormente.

2. Se mide la concentración de daidzeína en la misma muestra biológica. La medida se lleva a cabo usando un método de medida existente (HPLC, GC-MS, o similar).

3. Para cada muestra biológica se calcula el log de la relación de la concentración de ecuol a la concentración de daidzeína. Debido a que el ecuol es un metabolito de daidzeína, es posible saber aproximadamente cuánto ecuol se produce *in vivo* calculando el valor del logaritmo.

4. La concentración de S-ecuol y la concentración de daidzeína en la muestra biológica se miden mediante HPLC.

5. En base al valor medido en 4 anteriormente, se calcula para cada muestra biológica el log de la relación de la concentración de ecuol a la concentración de daidzeína.

6. Los log de las relaciones obtenidos en 3 anteriormente se comparan con el valor de referencia determinado mediante los log de las relaciones obtenidos en 5 anteriormente, y los resultados obtenidos en 3 anteriormente se dividen entre grupos de producción de ecuol y grupos no de producción de ecuol. Basándonos en esto, se determina la concentración de ecuol a la que la tasa de determinación errónea entre no productores de ecuol y productores de ecuol es la más baja, y esta concentración se establece como el valor de corte.

Con respecto a 6 anteriormente, específicamente, en el caso cuando los log de las relaciones calculados mediante HPLC, por ejemplo, son menores que -1,75, se determina que los sujetos no son productores de ecuol, y cuando las relaciones son -1,75 o mayores, se determina que los sujetos son productores de ecuol, este valor (-1,75) se usa como el valor de referencia (por ejemplo, véase Setchell y Co, 2006). Entonces, los log de las relaciones obtenidos en 3 anteriormente se comprueban frente al valor de referencia, y los sujetos se dividen en forma similar en no productores de ecuol (si el valor es menor que -1,75) y productores de ecuol (si el valor es -1,75 o mayor). Subsiguientemente, cada concentración de ecuol medida en 1 anteriormente se comprueba frente a la clasificación. Usando como criterio la clasificación anterior, se determina la concentración de ecuol a la cual la tasa de determinación errónea entre no productores de ecuol y productores de ecuol es la más baja; y esta concentración se establece como el valor de corte.

Además, en la Etapa (2), se puede determinar que un sujeto en el que se detecta una concentración elevada de ecuol a partir de su muestra biológica en la Etapa (1) tiene una capacidad productora de ecuol elevada, y se puede determinar que un sujeto en el que se detecta una concentración baja de ecuol a partir de su muestra biológica en la Etapa (1) tiene una capacidad productora de ecuol baja.

Ejemplos

Se conoce la presencia de dos diastereoisómeros diferentes de ecuol, es decir, S-ecuol y R-ecuol. El primero, es decir, S-ecuol, es el único tipo que está presente *in vivo*. Por lo tanto, el método de medida es necesario para medir específicamente de forma exacta S-ecuol. En consecuencia, se examinó un antígeno patrón y un antígeno marcado que afecta a la medida mediante inmunoensayo competitivo.

A continuación se describen los métodos de medida evaluados y sus resultados.

<Ejemplo de Ensayo 1>

Ejemplo 1

Medida mediante kit de medida que usa S-ecuol tanto como antígeno marcado como antígeno patrón

1. Muestra biológica

Como muestra biológica, se usó orina. El número de muestras biológicas fue 5.

2. Preparación de disolución de antisuero de conejo anti-ecuol (anticuerpo primario)

Síntesis de antígeno inmunizante

Se disolvió ecuol (100 mg) en DMSO (400 μ l), y se añadieron bromoacetato de metilo (58 μ l) y K_2CO_3 (140 mg) para la reacción a 25°C durante 4 horas. Después de terminar la reacción, la mezcla se ajustó hasta acidez usando ácido clorhídrico, se extrajo usando acetato de etilo, se deshidrató, y entonces se evaporó hasta sequedad.

Subsiguientemente, la mezcla se desarrolló y se separó en una cromatografía de capa fina (1.05717, Merck, Japón) usando cloroformo:metanol (19:1) como disolvente de desarrollo, y solamente se recogió una fracción en la que se introdujo una molécula de éster metílico de CME (carboximetiléter) en una molécula de ecuol.

Se añadió hidróxido de sodio 8N al ecuol-éster metílico de CME recogido, y la mezcla se calentó a 50°C durante 20 minutos. Tras calentar, la mezcla se ajustó hasta acidez usando ácido clorhídrico, se extrajo usando acetato de etilo, y se evaporó hasta sequedad, obteniendo de ese modo ecuol-ácido de CME.

Al ecuol-ácido de CME así obtenido (2 mg) se añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS) (1,5 mg) y carbodiimida soluble en agua (WSC) (1,5 mg). La mezcla se disolvió en DMSO (20 μ l) y se dejó reaccionar a 25°C durante 1 hora, obteniendo así ecuol-CME-NHS.

Se añadió ecuol-CME-NHS (disolución en DMF 10 mg/ml) (10 μ l) a una disolución de BSA 20 mg/ml (250 μ l, en la que se disolvió seroalbúmina bovina (20 mg) en tampón de ácido carbónico 50 mM (pH 9,7, 1 ml)) para la reacción a 25°C durante 30 minutos. Tras terminar la reacción, se eliminó una sustancia sin reaccionar mediante filtración en gel, y la disolución resultante se usó como una disolución madre del antígeno de ecuol-CME-BSA.

Preparación del antisuero

El antígeno inmunizante sintetizado ecuol-CME-BSA (2,5 mg/ml) y adyuvante completo de Freund se mezclaron en cantidades iguales para preparar un agente inmunizante. El agente inmunizante se inyectó subcutáneamente (1 ml por disparo, cada 3 semanas) en varios sitios en la espalda de conejos. La recogida de sangre se inició 12 semanas después del comienzo de la inmunización, y se recogió sangre cada 3 semanas. Después de que se recogió parcialmente sangre 5 veces, se recogió sangre completa. La Tabla 1 muestra los títulos de anticuerpo de los antisueros recolectados. Los antisueros obtenidos mediante recogida de sangre completa se diluyeron adecuadamente con tampón de dilución del antisuero, y se usaron en los siguientes ensayos.

Obsérvese que, aquí, el factor de dilución máximo del antisuero individual en el que se pueden detectar anticuerpos mediante un método conocido hasta ahora se consideró como el título del anticuerpo. La dilución se llevó a cabo usando el tampón de dilución del antisuero descrito más tarde.

[Tabla 1]

Título del anticuerpo de antisuero procedente de cada recogida de sangre						
Antisuero	Recogida de sangre 1	Recogida de sangre 2	Recogida de sangre 3	Recogida de sangre 4	Recogida de sangre 5	Recogida de sangre 6 Recogida de sangre completa
No. 11	49.000	80.000	130.000	160.000	200.000	280.000

3. Preparación de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (anticuerpo secundario) y placa de fase sólida con anticuerpo

5 Se añadieron 10 ug/ml de disolución de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (100 µl) a cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos. Después de que la microplaca se dejó reposar a 4°C durante 2 noches, la disolución de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo se eliminó mediante succión.

10 Se añadió disolución de seroalbúmina bovina 0,5 mg/ml (300 µl) a cada pocillo de la placa de 96 pocillos de la que se eliminó por succión la disolución. Después de que la microplaca se dejó reposar a 4°C durante 18 horas, la disolución de seroalbúmina bovina se eliminó por succión, y el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo se inmovilizó a la placa mediante secado a vacío.

4. Preparación de S-ecul marcado con peroxidasa de rábano picante (antígeno marcado que compite con ecul en muestra biológica)

15 Se disolvió S-ecul (100 mg) en DMSO (400 µl), y se añadieron ácido 4-bromo-n-butílico (58 µl) y K₂CO₃ (140 mg) para la reacción a 25°C durante 4 horas. Después de terminar la reacción, la mezcla se ajustó hasta acidez usando ácido clorhídrico, se extrajo usando acetato de etilo, se deshidrató, y entonces se evaporó hasta sequedad.

Subsiguientemente, la mezcla se desarrolló y se separó mediante cromatografía de capa fina (1.05717, Merck, Japón) usando cloroformo:metanol (19:1) como agente de desarrollo; y solamente se recogió una fracción en la que se introdujo una molécula de éster metílico de CPE (carboxipropil éter) en una molécula de S-ecul.

20 Se añadió hidróxido de sodio 8N al S-ecul-éster metílico de CPE recogido, y la mezcla se calentó a 50°C durante 20 minutos. Tras calentar, la mezcla se ajustó hasta acidez usando ácido clorhídrico, se extrajo usando acetato de etilo, y se evaporó hasta sequedad, obteniendo de ese modo S-ecul-ácido de CPE.

Se añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS) (1,5 mg) y carbodiimida soluble en agua (WSC) (1,5 mg) al S-ecul-ácido de CPE así obtenido (2 mg). La mezcla se disolvió en DMSO (20 µl) y se dejó reaccionar a 25°C durante 1 hora, obteniendo así S-ecul-CPE-NHS.

25 S-ecul-CPE-NHS (disolución en DMF 10 mg/ml) (10 µl) se añadió a una disolución de HRP 20 mg/ml (250 µl, en la que se disolvió peroxidasa de rábano picante (20 mg) en tampón de ácido carbónico 50 mM (pH 9,7, 1 ml)) para la reacción a 25°C durante 30 minutos. Tras terminar la reacción, se eliminó una sustancia sin reaccionar mediante filtración en gel, y la disolución resultante se usó como disolución madre (disolución de antígeno marcado) de disolución de S-ecul marcado con peroxidasa de rábano picante.

30 5. Antígeno patrón

Como antígeno patrón, se usó S-ecul. Obsérvese que se usó una disolución patrón de ecul en forma de una disolución mixta de S-ecul (0, 30, 90, 270, u 810 ng/ml) y suero humano tratado con carbón al 100%.

6. Diluyente de muestra biológica y diluyente de antígeno patrón

35 Como diluyente para la muestra biológica (muestra) y para el antígeno patrón, se usó suero humano tratado con carbón al 100% (Seracon II: CD Intergen).

7. Composición de tampón de dilución del antisuero

Como tampón de dilución del antisuero, se usó tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,5) que contiene cloruro de sodio 150 mM, 0,5% de seroalbúmina bovina, y 0,01% de Tween 20. Obsérvese que Tween es una marca registrada.

8. Composición de la disolución de lavado

40 Como disolución de lavado, se usó tampón de fosfato 0,3 mM (pH 7,5) que contiene cloruro de sodio 100 mM y 0,025% de Tween 20.

9. Composición de la disolución de enzima

Como disolución de enzima, se usó tampón de ácido acético 0,1 M (pH 5,5) que contiene 6% de β-glufatasa (Nippon Biotest Laboratories).

45 10. Sustrato

Como sustrato (disolución de sustrato), se usó tampón de citrato 50 mM (pH 5,5) que contiene disolución de peróxido de hidrógeno al 0,05% y 2,2 mg/ml de OPD (dihidrocloreto de o-fenilendiamina).

11. Disolución de parada de la reacción

Como disolución de parada de la reacción, se usó ácido sulfúrico 3N.

12. Medida de ecuol usando una muestra biológica

Se añadió un diluyente (200 μ l) a una muestra de orina (20 μ l) para preparar una muestra de orina diluida 11 veces. Una disolución mixta (50 μ l) de la muestra de orina diluida 11 veces (20 μ l), enzima y antígeno marcado (la relación de disolución de enzima a disolución de antígeno marcado es 10:1) se añadió a los pocillos de una placa que contienen anticuerpo de cabra inmovilizado anti-IgG de conejo. La placa se agitó, y después se dejó reposar a 25°C durante 30 minutos. Subsiguientemente, se le añadió la disolución de antisuero de conejo anti-ecuol (50 μ l), y la mezcla se agitó y después se dejó reposar a 25°C durante 1 hora.

Después de que la disolución de la reacción se eliminó de los pocillos de la placa que contienen anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, los pocillos se lavaron 3 veces usando la disolución de lavado. Tras lavar, el sustrato (100 μ l) se añadió a los pocillos de la placa que contienen anticuerpo de cabra inmovilizado anti-IgG de conejo, y la placa se dejó reposar a 25°C durante 30 minutos. Subsiguientemente, la disolución de parada de la reacción (100 μ l) se añadió a los pocillos de la placa que contienen anticuerpo de cabra inmovilizado anti-IgG de conejo, y se midió la absorción a la longitud de onda de 490 nm. Después, la concentración de ecuol en la muestra se calculó a partir de una curva patrón generada a partir de una serie de diluciones (preparado usando un diluyente patrón) del antígeno patrón, que se midió de la misma manera.

Ejemplo 2

Medida mediante kit de medida usando S-ecuol como antígeno marcado

El Ejemplo 2 se llevó a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 1, excepto que el “antígeno patrón” en el Ejemplo 1 se cambió de S-ecuol a ecuol (una mezcla de S-ecuol y R-ecuol).

Ejemplo 3

Medida mediante kit de medida usando S-ecuol como antígeno patrón

El Ejemplo 3 se llevó a cabo de la misma manera como en el Ejemplo 1, excepto que el S-ecuol en la “preparación de S-ecuol marcado con peroxidasa de rábano picante” en el Ejemplo 1 se cambió a ecuol (una mezcla de S-ecuol y R-ecuol), como se describe más abajo.

Preparación de ecuol marcado con peroxidasa de rábano picante

Se disolvió ecuol (100 mg) en DMSO (400 μ l), y se añadieron ácido 4-bromo-n-butilico (58 μ l) y K_2CO_3 (140 mg) para la reacción a 25°C durante 4 horas. Tras terminar la reacción, la mezcla se ajustó hasta acidez usando ácido clorhídrico, se extrajo usando acetato de etilo, se deshidrató, y después se evaporó hasta sequedad.

Subsiguientemente, la mezcla se desarrolló y se separó en una cromatografía de capa fina (1.05717, Merck, Japón) usando cloroformo:metanol (19:1) como agente de desarrollo; y solamente se recogió una fracción en la que se introdujo una molécula de éster metílico de CPE (carboxipropil éter) en una molécula de ecuol.

Se añadió hidróxido de sodio 8N al ecuol-éster metílico de CPE recogido, y la mezcla se calentó a 50°C durante 20 minutos. Tras calentar, la mezcla se ajustó hasta acidez usando ácido clorhídrico, se extrajo usando acetato de etilo, y se evaporó hasta sequedad, obteniendo de ese modo ecuol-ácido de CPE.

Al ecuol-ácido de CPE así obtenido (2 mg) se añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS) (1,5 mg) y carbodiimida soluble en agua (WSC) (1,5 mg). La mezcla se disolvió en DMSO (20 μ l) y se dejó reaccionar a 25°C durante 1 hora, obteniendo así ecuol-CPE-NHS.

Se añadió ecuol-CPE-NHS (disolución en DMF 10 mg/ml) (10 μ l) a una disolución de HRP 20 mg/ml (250 μ l, en la que se disolvió peroxidasa de rábano picante (20 mg) en tampón de ácido carbónico 50 mM (pH 9,7, 1 ml)) para la reacción a 25°C durante 30 minutos. Tras terminar la reacción, se eliminó una sustancia sin reaccionar mediante filtración en gel, y la disolución resultante se usó como una disolución madre de disolución de ecuol marcado con peroxidasa de rábano picante.

Ejemplo Comparativo

Medida mediante kit de medida usando ecuol tanto como antígeno marcado como antígeno patrón

El Ejemplo Comparativo se realizó de la misma manera como en el Ejemplo 1, excepto que el S-ecuol como el “antígeno patrón” en el Ejemplo 1 se cambió al ecuol descrito en el Ejemplo 2; y el S-ecuol en la “preparación de S-ecuol marcado con peroxidasa de rábano picante” se cambió al ecuol descrito en el Ejemplo 3.

Ejemplo 4

Comparación de valores medidos frente a HPLC (muestra de panel)

Cinco muestras de orina, en las que la concentración de ecuol es conocida mediante HPLC, se midieron según el Ejemplo 1, Ejemplo 2, Ejemplo 3 y el Ejemplo Comparativo. La Tabla 2 muestra sus resultados. La Tabla 3 muestra la relación de cada valor medido, suponiendo que el valor medido mediante HPLC es 100%.

5

[Tabla 2]

Valores medidos de 5 muestras de orina (ng/ml)					
	HPLC	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo Comparativo
Muestra de orina A	507	541	659	808	418
Muestra de orina B	1.775	1.703	2.175	1.844	906
Muestra de orina C	4.008	3.961	5.044	5.353	2.385
Muestra de orina D	8.360	7.436	9.332	7.691	3.251
Muestra de orina E	12.540	11.447	13.230	12.315	4.877

[Tabla 3]

Relación (%) de valores medidos de 5 muestras de orina a valores medidos mediante HPLC				
	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo Comparativo
Muestra de orina A	107	130	159	82
Muestra de orina B	96	123	104	51
Muestra de orina C	99	126	134	60
Muestra de orina D	89	112	92	39
Muestra de orina E	91	106	98	39

- 10 Mientras que la relación de los resultados medidos a partir del Ejemplo Comparativo a los resultados medidos a partir de HPLC está en el intervalo de 39% a 82%, las relaciones obtenidas de los Ejemplos 1, 2, y 3 están en los intervalos de 89% a 107%, 106% a 130%, y 92% a 159%, respectivamente. El uso de S-ecuol como el antígeno patrón y/o el antígeno marcado estrechó la discrepancia entre los valores medidos obtenidos con y sin HPLC.

Ejemplo 5

Correlación con HPLC (valor medido)

- 15 Cincuenta muestras de orina, en las que la concentración de ecuol es conocida mediante HPLC, se midieron de la misma manera descrita en el Ejemplo 1, Ejemplo 2, Ejemplo 3, y el Ejemplo Comparativo. Las correlaciones entre los resultados a partir de estos Ejemplos y los resultados de medida a partir de HPLC se muestran respectivamente en las Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, y Fig. 4. Se pidió a un sujeto que ingiriera isoflavona de haba de soja (26 mg de aglicona de isoflavona) el día antes de la medida, y como muestra de orina se usó la primera orina excretada en la mañana.
- 20 Aunque los resultados de medida procedentes del Ejemplo Comparativo muestran una correlación elevada (coeficiente de correlación $r = 0,973$), la pendiente de la ecuación de regresión es 0,664, es decir, casi la mitad del valor medido obtenido mediante HPLC.

- 25 Por otro lado, el resultado de medida del Ejemplo 1 muestra una correlación elevada (coeficiente de correlación $r = 0,974$), y la pendiente de la ecuación de regresión es 1,067, es decir, comparable al valor medido obtenido mediante HPLC. Por lo tanto, se determinó que la exactitud estaba más incrementada en el Ejemplo 1 que en el Ejemplo Comparativo.

Obsérvese que los resultados de medida procedentes del Ejemplo 2 muestran una correlación elevada (coeficiente de correlación $r = 0,987$), y que la pendiente de la ecuación de regresión es 1,594, es decir, mayor que el valor medido obtenido mediante HPLC.

Obsérvese que los resultados de medida procedentes del Ejemplo 3 muestran una correlación elevada (coeficiente de correlación $r = 0,973$), y que la pendiente de la ecuación de regresión es 1,712, es decir, mayor que el valor medido obtenido mediante HPLC. La gráfica (Fig. 3) muestra una gran variación en los resultados de medida. Se observa una discrepancia en los valores medidos, especialmente en los valores medidos en el intervalo elevado.

5 <Ejemplo de Ensayo 2>

Reactividad cruzada

En este Ejemplo de Ensayo, se examinó la reactividad cruzada del anticuerpo primario para el caso en el que se empleó ELISA y se usó S-ecuol tanto como el antígeno patrón como el antígeno marcado. Específicamente, la reactividad cruzada se examinó según lo siguiente.

10 1. Muestra

Cada una de las isoflavonas y similares mostradas en la Tabla 4 descrita más tarde se disolvió en suero humano tratado con carbón al 100%, y la disolución resultante se usó como muestra.

2. Anticuerpo primario

15 Se usó un antisuero de conejo anti-ecuol como el anticuerpo primario, como en el Ejemplo 1. El antisuero se diluyó adecuadamente con el tampón de dilución del antisuero descrito más tarde, y se usó en el ensayo.

3. Anticuerpo secundario

Se usó un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo como anticuerpo secundario, como en el Ejemplo 1. El anticuerpo se inmovilizó a una fase sólida como en el Ejemplo 1, preparando así una placa que contiene anticuerpo de cabra inmovilizado anti-IgG de conejo.

20 4. Antígeno marcado que compite con ecuol en muestra biológica

Se usó S-ecuol marcado con peroxidasa de rábano picante como antígeno marcado, como en el Ejemplo 1.

5. Antígeno patrón

25 Se usó S-ecuol como antígeno patrón, como en el Ejemplo 1. Obsérvese que se usó una disolución patrón de ecuol en forma de una disolución mixta de S-ecuol (0, 30, 90, 270, u 810 ng/ml) y suero humano tratado con carbón al 100%.

6. Diluyente para muestra y antígeno patrón

Se usó suero humano tratado con carbón al 100% (Seracon II: CD Intergen) como diluyente para la muestra y para el antígeno patrón.

7. Tampón de dilución del antisuero

30 Como tampón de dilución del antisuero, se usó tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,5) que contiene cloruro de sodio 150 mM, 0,5% de seroalbúmina bovina, y 0,01% de Tween 20.

8. Disolución de lavado

Como disolución de lavado, se usó tampón de fosfato 0,3 mM (pH 7,5) que contiene cloruro de sodio 100 mM y 0,025% de Tween 20.

35 9. Disolución de enzima

Como disolución de enzima, se usó tampón de ácido acético 0,1 M (pH 5,5) que contiene 6% de β -glufatasa (Nippon Biotest Laboratories).

10. Sustrato

40 Como sustrato (disolución de sustrato), se usó tampón de citrato 50 mM (pH 5,5) que contiene disolución de peróxido de hidrógeno al 0,05% y 2,2 mg/ml de OPD (dihidrocloreto de o-fenilendiamina).

11. Disolución de parada de la reacción

Como disolución de parada de la reacción, se usó ácido sulfúrico 3N.

12. Procedimiento para examinar la reactividad cruzada

Se preparó una serie de diluciones de concentración para cada una de las isoflavonas y similares, y para S-ecuol sin marcar. La adsorción por cada una de las isoflavonas y similares, y la adsorción por S-ecuol sin marcar, en la reacción competitiva, se midieron desde cuando las concentraciones de estas sustancias fueron 0 hasta cuando las concentraciones de estas sustancias se añadieron en cantidades en exceso. Cada uno de los valores medidos así obtenidos se comprobó frente a una curva patrón obtenida a partir de la serie de diluciones del antígeno patrón (S-ecuol), para comparar la inhibición de la reacción en base a cada valor calculado. De ese modo, se determinó la concentración (IC₂₀) de cada una de las isoflavonas y similares, así como la concentración (IC₂₀) de S-ecuol sin marcar, a las que la reacción de unión de S-ecuol marcado al anticuerpo anti-ecuol es inhibida en un 20%.

La reacción competitiva se llevó a cabo usando ELISA competitivo mediante un procedimiento similar a aquel en el Ejemplo 1. Además, como sustancia marcadora, se usó peroxidasa de rábano picante.

La relación (expresada en porcentaje) de la concentración así obtenida de cada una de las isoflavonas y similares a la concentración así obtenida de S-ecuol sin marcar se consideró como la reactividad cruzada. Esto se representa mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Reactividad cruzada (\%)} = (\text{IC}_{20} \text{ de S-ecuol} / \text{IC}_{20} \text{ de cada isoflavona, etc.}) \times 100$$

La Tabla 4 muestra los resultados.

[Tabla 4]

Isoflavonas y similares	Tasa de reactividad cruzada
S-Ecuol	100,00%
R-Ecuol	13,24%
Daidzeína	0,08%
Genisteína	0,05%
Gliciteína	0,03%
Glicitina	0,02%
Estradiol	0,01%
Daidzina	0,06%
Genistina	0,06%
Biochanina A	0,11%
Formononetina	0,21%
Dihidrodaizeína	1,03%
Apigenina	0,00%
Luteolina	0,00%
Deshidroecuol	0,33%

Según los resultados, cuando la reactividad cruzada del anticuerpo primario con S-ecuol se supone que es 100%, su reactividad cruzada con R-ecuol es 13,24%, su reactividad cruzada con daidzeína antes de ser metabolizada es 0,08%, su reactividad cruzada con dihidrodaidzeína es 1,03%, su reactividad cruzada con deshidroecuol es 0,33%, y su reactividad cruzada con daidzeína es 0,06%. Los resultados muestran que el anticuerpo primario también tiene una reactividad cruzada significativamente baja con otras diversas sustancias. Esto significa que S-ecuol se puede detectar y medir específicamente mediante el método de la presente invención, y adicionalmente mediante el kit de la presente invención.

Además, por ejemplo, cuando se usa Labmaster Equol TR-FIA, que es un kit conocido hasta ahora fabricado por Labmaster, la tasa de reactividad cruzada con daidzeína es 0,8% (véase <http://labmaster.fi/products/tr-fia-kitS-equol-tr-fia.htm>), y la reactividad cruzada del kit es 10 veces tan alta como la del presente kit. Además, cuando se usa Labmaster Equol TR-FIA, la tasa de reactividad cruzada con deshidroecuol es 42,3%, y la tasa de reactividad

cruzada con dihidrodaidzeína es 4,0%. De este modo, se considera que el presente kit muestra especificidad significativamente mayor, en comparación con un kit conocido hasta ahora.

- 5 Además, en el pasado, un artículo (Duncan C.S. Talbot, et al. Clinical Chemistry 53: 748-756, 2007) que trata sobre la investigación que usa un anticuerpo monoclonal dio a conocer que la tasa de reactividad cruzada con daidzeína fue <0,04%. Esto indica que aunque la presente invención usa un antisuero como el anticuerpo primario, muestra especificidad que es equivalente a la del anticuerpo monoclonal.

<Ejemplo de Ensayo 3>

Correlación con cromatografía de líquidos/espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS)

- 10 En este Ejemplo de Ensayo, se examinó la correlación con un método de LC/MS/MS para el caso cuando se empleó ELISA competitivo, y cuando se usó S-ecuol tanto como el antígeno patrón como el antígeno marcado. Específicamente, la correlación se examinó según lo siguiente.

1. Muestra biológica

Como muestras biológicas, se usaron sueros de 10 hombres antes y después de que ingirieran isoflavona.

2. Anticuerpo primario

- 15 Como anticuerpo primario, se usó el mismo antisuero de conejo anti-ecuol que el usado en el Ejemplo 1. El antisuero se diluyó adecuadamente con el tampón de dilución del antisuero descrito más tarde, y se usó en el ensayo.

3. Anticuerpo secundario

- 20 Como anticuerpo secundario, se usó el mismo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo que el usado en el Ejemplo 1. El anticuerpo se inmovilizó a una fase sólida como en el Ejemplo 1, preparando así una placa que contiene anticuerpo de cabra inmovilizado anti-IgG de conejo.

4. Antígeno marcado que compite con ecuol en muestra biológica

Como el antígeno marcado, se usó la misma disolución de antígeno marcado de S-ecuol marcado con peroxidasa de rábano picante que la usada en el Ejemplo 1.

5. Antígeno patrón

- 25 Se usó S-ecuol como antígeno patrón como en el Ejemplo 1. Obsérvese que se diluyó adecuadamente S-ecuol 810 ng/ml con el diluyente del antígeno patrón, y la disolución resultante se usó como una disolución patrón de ecuol.

6. Diluyente del antígeno patrón

Como diluyente para el antígeno patrón, se usó suero humano tratado con carbón al 100%.

7. Tampón de dilución del antisuero

- 30 Como tampón de dilución del antisuero, se usó tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,5) que contiene cloruro de sodio 150 mM, 0,5% de seroalbúmina bovina, y 0,01% de Tween 20.

8. Disolución de lavado

Como disolución de lavado, se usó tampón de fosfato 0,3 mM (pH 7,5) que contiene cloruro de sodio 100 mM y 0,025% de Tween 20.

- 35 9. Disolución de enzima

Como disolución de enzima, se usó tampón de ácido acético 0,1 M (pH 5,5) que contiene 6% de β -glutafasa (Nippon Biotest Laboratories).

10. Sustrato

- 40 Como sustrato (disolución de sustrato), se usó tampón de citrato 50 mM (pH 5,5) que contiene disolución de peróxido de hidrógeno al 0,05% y 2,2 mg/ml de OPD (dihidrocloreto de o-fenilendiamina).

11. Disolución de parada de la reacción

Como disolución de parada de la reacción, se usó ácido sulfúrico 3N.

12. Procedimiento para medir la concentración de ecuol

Una disolución mixta (50 µl) de muestra de suero (20 µl), enzima, y antígeno marcado (la relación de disolución de enzima a disolución de antígeno marcado es 10:1) se añadió a los pocillos de una placa que contienen anticuerpo de cabra inmovilizado anti-IgG de conejo, y la placa se agitó y después se dejó reposar a 25°C durante 30 minutos. Subsiguientemente, se le añadió la disolución de antisuero de conejo anti-ecuol (50 µl), y la mezcla se agitó y después se dejó reposar a 25°C durante 1 hora.

Después de que la disolución de la reacción se eliminó de los pocillos de la placa que contienen anticuerpo de cabra inmovilizado anti-IgG de conejo, los pocillos se lavaron 3 veces usando la disolución de lavado. Tras lavar, se añadió el sustrato (100 µl) a los pocillos de la placa que contienen anticuerpo de cabra inmovilizado anti-IgG de conejo, y la placa se dejó reposar a 25°C durante 30 minutos. Subsiguientemente, la disolución de parada de la reacción (100 µl) se añadió a los pocillos de la placa que contienen anticuerpo de cabra inmovilizado anti-IgG de conejo, y se midió la absorción a la longitud de onda de 490 nm. Después, la concentración de ecuol en la muestra se calculó a partir de una curva patrón generada a partir de una serie de diluciones (preparada usando un diluyente patrón) del antígeno patrón, que se midió de la misma manera.

Además, la concentración de ecuol en la misma muestra biológica se midió usando una cromatografía de líquidos/espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS). Se compararon los resultados así obtenidos. La Tabla 5 y la Fig. 6 muestran las correlaciones de los resultados.

[Tabla 5]

	LCMSMS (ng/ml)	ELISA (ng/ml)
Muestra de suero 1	3,5	1,0
Muestra de suero 2	2,8	2,0
Muestra de suero 3	21,0	7,8
Muestra de suero 4	35,6	17,9
Muestra de suero 5	50,9	19,0
Muestra de suero 6	49,5	22,8
Muestra de suero 7	63,9	24,9
Muestra de suero 8	55,9	19,2
Muestra de suero 9	78,7	30,2
Muestra de suero 10	121,9	56,3
Coefficiente de correlación		0,984

La Tabla 5 muestra que los valores absolutos de los resultados de medida de las muestras de suero obtenidos en el Ejemplo 4 son menores (menos de la mitad) que los obtenidos mediante LC/MS/MS. Sin embargo, la Tabla 5 muestra un coeficiente de correlación elevado (0,984).

<Ejemplo de Ensayo 4>

Determinación 1 de productor de S-ecuol/no productor de S-ecuol (ajuste del valor de corte)

En el presente ejemplo de ensayo, el valor de corte se ajustó de la siguiente manera.

Se solicitó a un sujeto que ingiriera isoflavona de haba de soja (alrededor de 25 mg de aglicona de isoflavona) durante la comida de la tarde el día antes de la medida, y la primera orina excretada en la mañana al menos 6 horas tras la ingestión se usó como la muestra de orina. El número de sujetos fue 244 (76 hombres y 168 mujeres), y el número de muestras biológicas fue 432.

La Fig. 7 muestra los resultados de medida en relación con la concentración de daidzeína (DZN). La concentración de DZN se midió usando HPLC. Se detectó una cantidad suficiente de DZN en la primera orina excretada en la mañana por la ingestión de isoflavona el día antes de la medida. En consecuencia, se decidió que es posible determinar productores de S-ecuol y no productores de S-ecuol.

A continuación, se midió mediante ELISA la concentración (EQL ELISA) de ecuol (EQL) en la orina. El límite de detección fue 330 ng/ml. Al mismo tiempo, el logaritmo de la relación (Log de la relación E/D) de la concentración de

EQL a la concentración de DZN se calculó en base a los resultados de la HPLC. La Fig. 8 muestra gráficas entre el EQL ELISA y el Log de la relación E/D. Obsérvese que el Log de la relación E/D, un valor de -1,75 (Kenneth D.R. Stechell y Sindley J. cole, J. Nutr. 136: 2188-2193, agosto de 2006) se usó como el valor de referencia, y se determinó que los sujetos con un valor de -1,75 o mayor son productores de ecuol; y se determinó que los sujetos con un valor menor que -1,75 son no productores de ecuol.

En base a lo anterior, se examinó la concentración de ecuol a la que la tasa de determinación errónea entre no productores de ecuol y productores de ecuol es la más baja, es decir, el valor de corte. La Tabla 6 muestra los resultados del examen. Obsérvese que, según HPLC, el número de muestras biológicas que se determinó que eran las productoras fue 377, y el número de muestras biológicas que se determinó que eran las no productoras fue 55.

[Tabla 6]

Valor de corte (ng/ml)	(1)		(2)		(3)	
	El número de muestras	Tasa de determinación errónea (%)	El número de muestras	Tasa de determinación errónea (%)	El número de muestras	Tasa de determinación errónea total (%)
330	23	41,8	2	0,5	25	42,3
400	16	29,1	4	1,1	20	30,2
450	14	25,5	5	1,3	19	26,8
500	11	20,0	8	2,1	19	22,1
550	9	16,4	11	2,9	20	19,3
600	8	14,5	15	4,0	23	18,5
650	5	9,1	17	4,5	22	13,6
700	4	7,3	20	5,3	24	12,6
750	3	5,5	25	6,6	28	12,1
800	2	3,6	29	7,7	31	11,3
850	2	3,6	31	8,2	33	11,9
900	2	3,6	35	9,3	37	12,9
950	1	1,8	39	10,3	40	12,2
1000	0	0,0	45	11,9	45	11,9

(1) Determinación errónea en la que se determina que los no productores de ecuol son productores de ecuol

El número de muestras sin capacidad productora de ecuol: 55

(2) Determinación errónea en la que se determina que los productores de ecuol son no productores de ecuol

El número de muestras con capacidad productora de ecuol: 377

(3) Determinación errónea total

Número total de muestras: 432

Según la Tabla 6, la tasa de determinación errónea entre productores de ecuol y no productores de ecuol fue la más baja cuando la concentración de ecuol fue 800 ng/ml. En consecuencia, en este caso, el valor de corte se fijó en 800 ng/ml.

<Ejemplo de Ensayo 5>

Determinación 2 de productor de S-ecuol/no productor de S-ecuol (ajuste del valor de corte)

El valor de corte como criterio para determinar productores de S-ecuol y no productores de S-ecuol se fijó de la misma manera como en el Ejemplo de Ensayo 4.

Obsérvese que el número de muestras biológicas en el inmunoensayo fue 713. Además, los valores indetectables se trataron como "0". La Tabla 7 muestra los resultados del examen.

5

[Tabla 7]

Valor de corte (ng/ml)	(1)		(2)		(3)	
	El número de muestras	Tasa de determinación errónea (%)	El número de muestras	Tasa de determinación errónea (%)	El número de muestras	Tasa de determinación errónea total (%)
330	63	18,9	1	0,3	64	19,2
400	45	13,6	3	0,8	48	14,4
450	35	10,7	4	1,1	39	11,7
500	29	8,6	7	1,9	36	10,4
550	22	6,5	10	2,7	32	9,2
600	18	5,3	14	3,7	32	9,0
650	13	3,8	16	4,3	29	8,1
700	11	3,3	19	5,1	30	8,3
750	9	2,7	24	6,4	33	9,0
800	6	1,8	28	7,4	34	9,2
850	5	1,5	30	8,0	35	9,5
900	4	1,2	34	9,0	38	10,2
950	3	0,9	38	10,1	41	11,0
1000	1	0,3	44	11,7	45	12,0
1050	1	0,3	47	12,5	48	12,8
1100	1	0,3	50	13,3	51	13,6
1150	1	0,3	50	13,3	51	13,6
1200	1	0,3	53	14,1	54	14,4
1250	1	0,0	54	14,4	55	14,4

(1) Determinación errónea en la que se determina que los no productores de ecuol son productores de ecuol

El número de muestras sin capacidad productora de ecuol: 337

(2) Determinación errónea en la que se determina que los productores de ecuol son no productores de ecuol

El número de muestras con capacidad productora de ecuol: 376

(3) Determinación errónea total

Número total de muestras: 713

Según la Tabla 7, la tasa de determinación errónea entre productores de ecuol y no productores de ecuol fue la más baja cuando la concentración de ecuol fue 650 ng/ml. En consecuencia, en este caso, el valor de corte se fijó a 650 ng/ml.

10

<Ejemplo de Ensayo 6>

Determinación 3 de productor de S-ecuol/no productor de S-ecuol

El valor de corte como criterio para determinar entre productores de S-ecuol y no productores de S-ecuol se fijó de la misma manera como en el Ejemplo de Ensayo 4.

- 5 Obsérvese que el número de muestras biológicas en el inmunoensayo fue 118. La Tabla 8 muestra los resultados del examen.

[Tabla 8]

Valor de corte (ng/ml)	(1)		(2)		(3)	
	El número de muestras	Tasa de determinación errónea (%)	El número de muestras	Tasa de determinación errónea (%)	El número de muestras	Tasa de determinación errónea total (%)
330	23	41,8	1	1,6	24	43,4
400	16	29,1	1	1,6	17	30,7
450	14	25,5	2	3,2	16	28,6
500	11	20,0	3	4,8	14	24,8
550	9	16,4	3	4,8	12	21,1
600	8	14,5	3	4,8	11	19,3
650	5	9,1	3	4,8	8	13,9
700	4	7,3	3	4,8	7	12,0
750	3	5,5	3	4,8	6	10,2
800	2	3,6	3	4,8	5	8,4
850	2	3,6	3	4,8	5	8,4
900	2	3,6	4	6,3	6	10,0
950	1	1,8	4	6,3	5	8,2
1000	0	0,0	4	6,3	4	6,3

(1) Determinación errónea en la que se determina que los no productores de ecuol son productores de ecuol

El número de muestras sin capacidad productora de ecuol: 55

(2) Determinación errónea en la que se determina que los productores de ecuol son no productores de ecuol

El número de muestras con capacidad productora de ecuol: 63

(3) Determinación errónea total

Número total de muestras: 118

- 10 Según la Tabla 8, la tasa de determinación errónea entre productores de ecuol y no productores de ecuol fue la más baja cuando la concentración de ecuol fue 1.000 ng/ml. En consecuencia, en este caso, el valor de corte se fijó en 1.000 ng/ml.

Aplicabilidad industrial

- 15 Cuando se ingieren productos procesados de haba de soja con la expectativa del efecto anti-estrogénico y del efecto semejante a estrógeno, la presencia de estos efectos se determina midiendo la concentración de ecuol en orina o sangre. Sin embargo, un método que usa análisis instrumental tal como HPLC y similar para medir de forma exacta el ecuol tarda mucho y requiere esfuerzo para procesar múltiples muestras, y de este modo no es adecuado para medidas diarias.

Sin embargo, según la presente invención, el ecuol en orina y sangre se puede medir de forma rápida y exacta, y es posible inferir los efectos de la ingestión de productos procesados de haba de soja, incluyendo la determinación del efecto de la administración de preparaciones seguras de *Lactobacillus* que producen ecuol.

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir ecuol en una muestra biológica mediante un método inmunológico, que comprende usar S-ecuol como al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón y un antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra biológica.
- 5 2. El método según la reivindicación 1, que comprende usar, como anticuerpo primario, un anticuerpo anti-ecuol cuya reactividad cruzada con daidzeína es 10% o menos; la reactividad cruzada con genisteína es 10% o menos; la reactividad cruzada con gliciteína es 10% o menos; la reactividad cruzada con dihidrodaidzeína es 20% o menos; y la reactividad cruzada con deshidroecuol es 20% o menos, cuando se supone que la reactividad cruzada con S-ecuol es 100%.
- 10 3. El método según la reivindicación 1, en el que una sustancia marcadora en el antígeno marcado es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en enzimas, radioisótopos, colorantes, materiales fluorescentes, látex, y coloides metálicos.
4. El método según la reivindicación 1, en el que el método inmunológico es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en ELISA, radioinmunoensayo, y ensayo inmunocromatográfico.
- 15 5. El método según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en orina y sangre.
6. El método según la reivindicación 1, en el que un conjugado de ecuol en la muestra biológica se mide sin estar desconjugado.
- 20 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el método usa S-ecuol como antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón y como antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra biológica.
8. Un kit para medir ecuol en una muestra biológica mediante un método inmunológico, que comprende S-ecuol como al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón y un antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra.
- 25 9. El kit según la reivindicación 8, que comprende además, como anticuerpo primario, un anticuerpo anti-ecuol cuya reactividad cruzada con daidzeína es 10% o menos; la reactividad cruzada con genisteína es 10% o menos; la reactividad cruzada con gliciteína es 10% o menos; la reactividad cruzada con dihidrodaidzeína es 20% o menos; y la reactividad cruzada con deshidroecuol es 20% o menos, cuando la reactividad cruzada con S-ecuol se supone que es 100%.
- 30 10. El kit según la reivindicación 8, en el que el método inmunológico es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en ELISA, radioinmunoensayo, y ensayo inmunocromatográfico.
11. El kit según la reivindicación 8, en el que la muestra biológica es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en orina y sangre.
- 35 12. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que el kit comprende S-ecuol como antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón, y como antígeno marcado que compite con ecuol en una muestra biológica.
13. Un método para determinar una capacidad productora de ecuol de un sujeto, que comprende las etapas de
 - (1) medir ecuol en una muestra biológica derivada de un sujeto que ha ingerido isoflavona de haba de soja, mediante un método inmunológico que usa S-ecuol como al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un antígeno patrón usado para la preparación de una curva patrón, y un antígeno marcado que compite con ecuol en la muestra biológica; y
 - (2) determinar una capacidad productora de ecuol del sujeto en base al valor medido de ecuol obtenido en la etapa (1).
- 40 14. El método de determinación según la reivindicación 13, en el que, en la etapa (1), un conjugado de ecuol en la muestra biológica se mide sin estar desconjugado.
- 45

Fig. 1

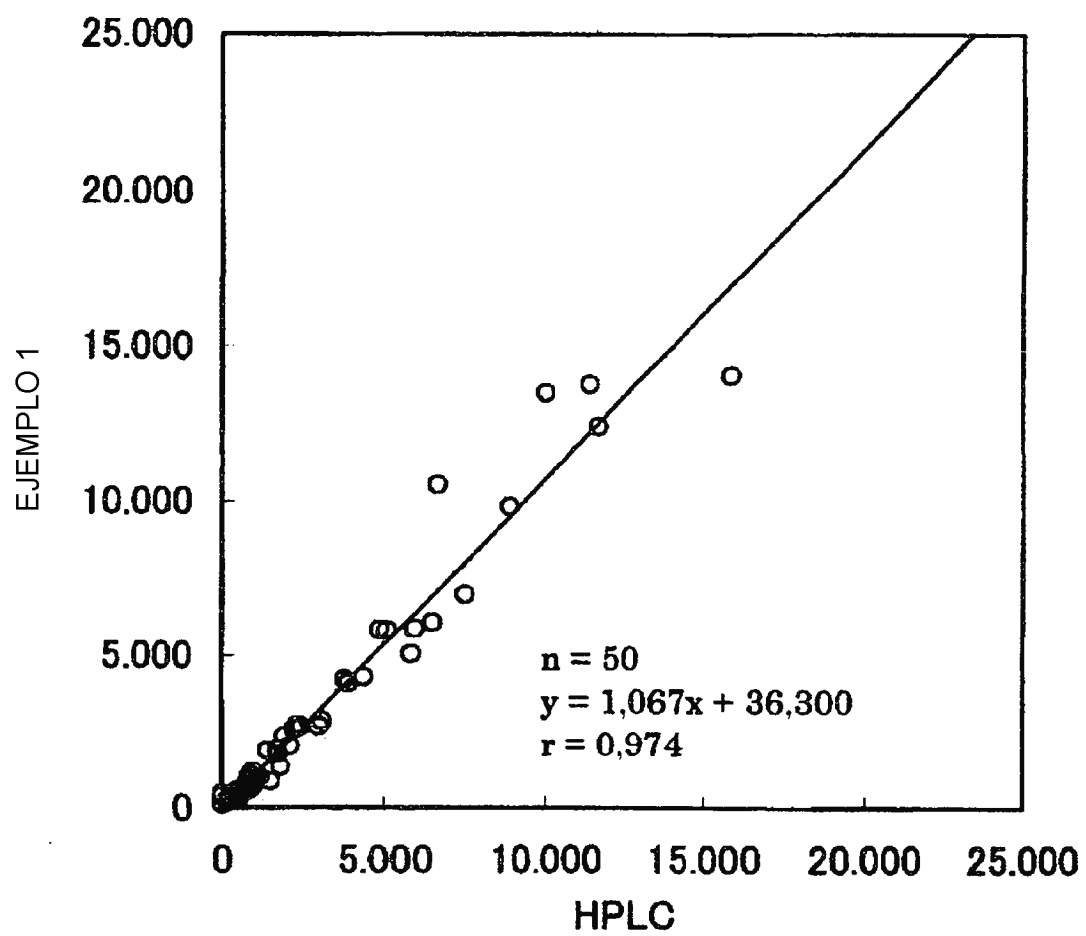


Fig. 2

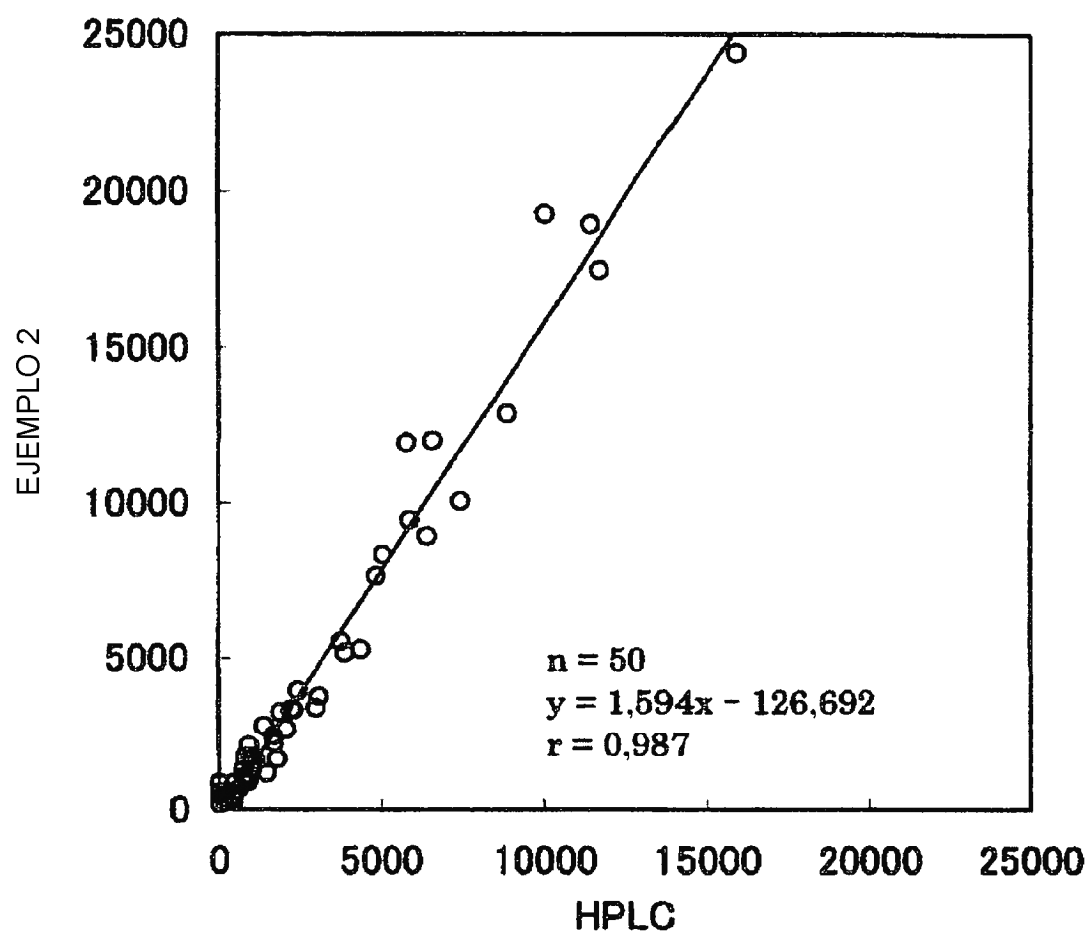


Fig. 3

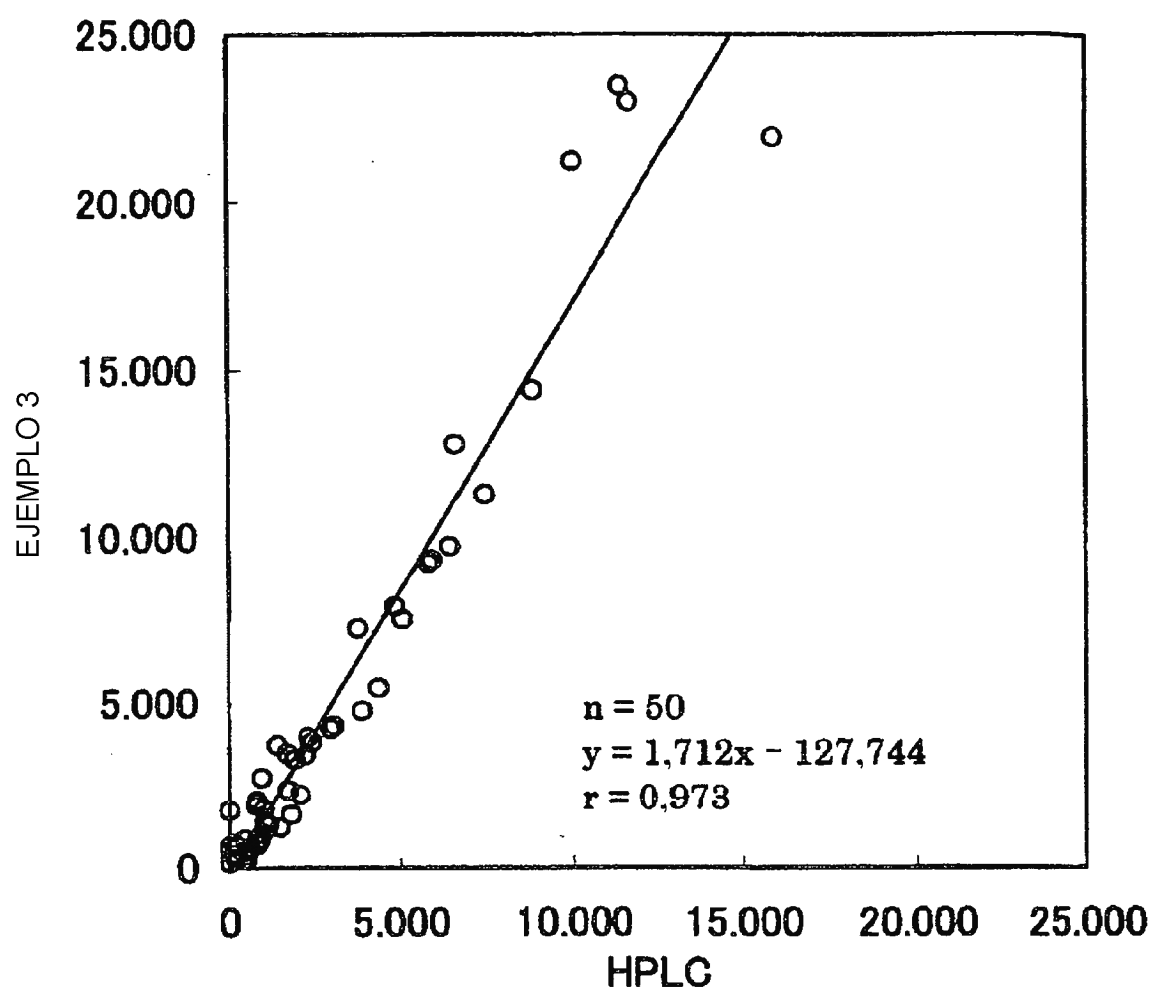


Fig. 4

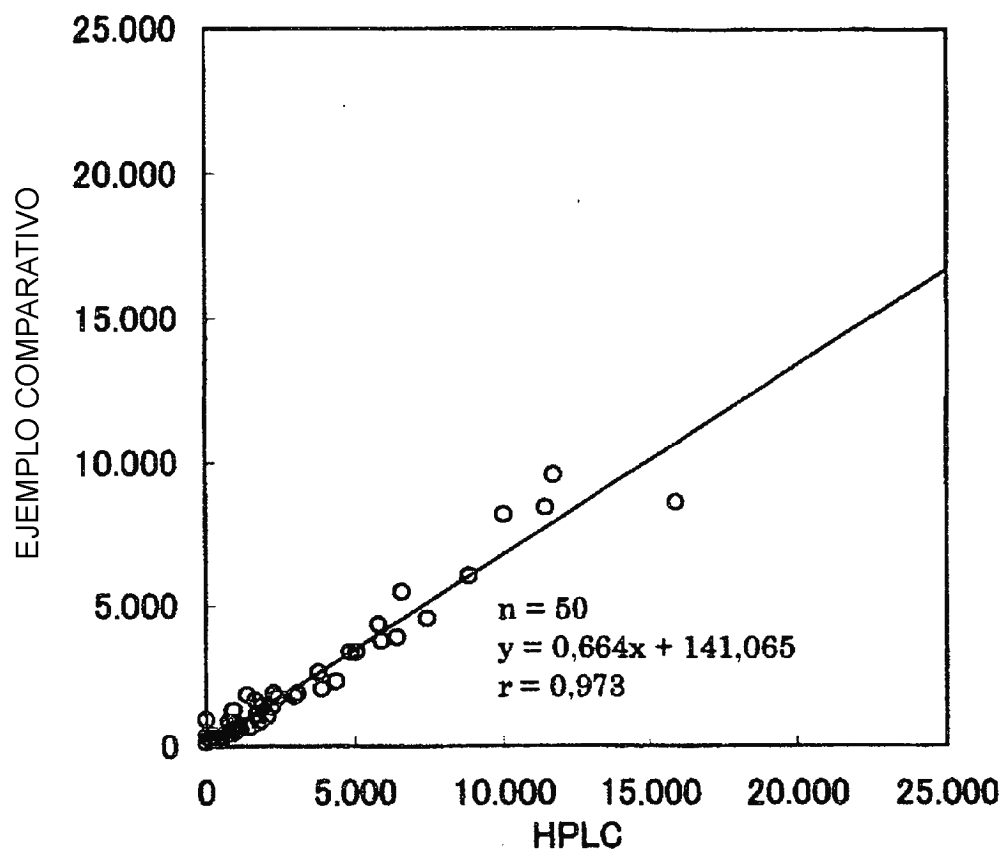


Fig. 5

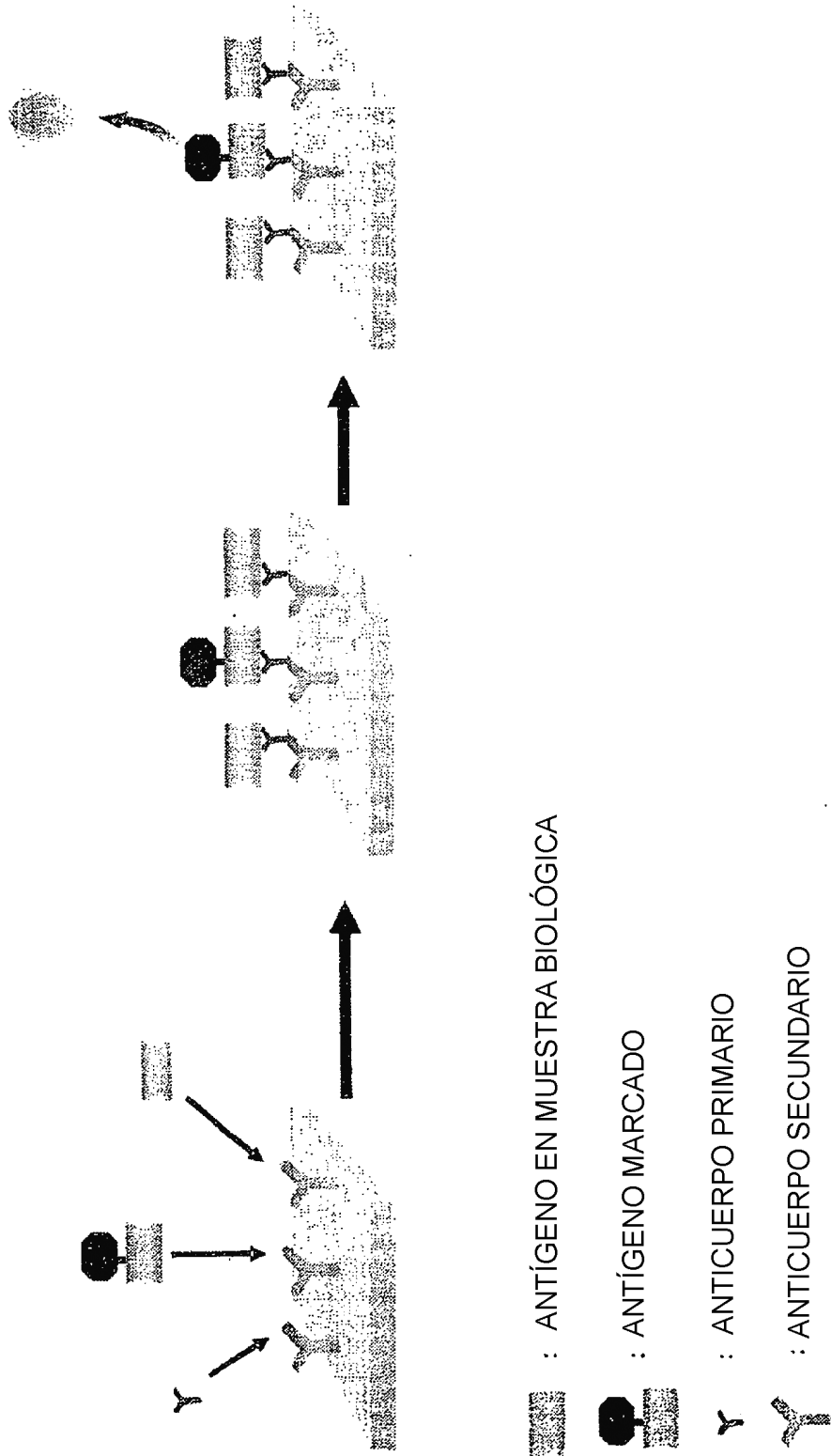


Fig. 6

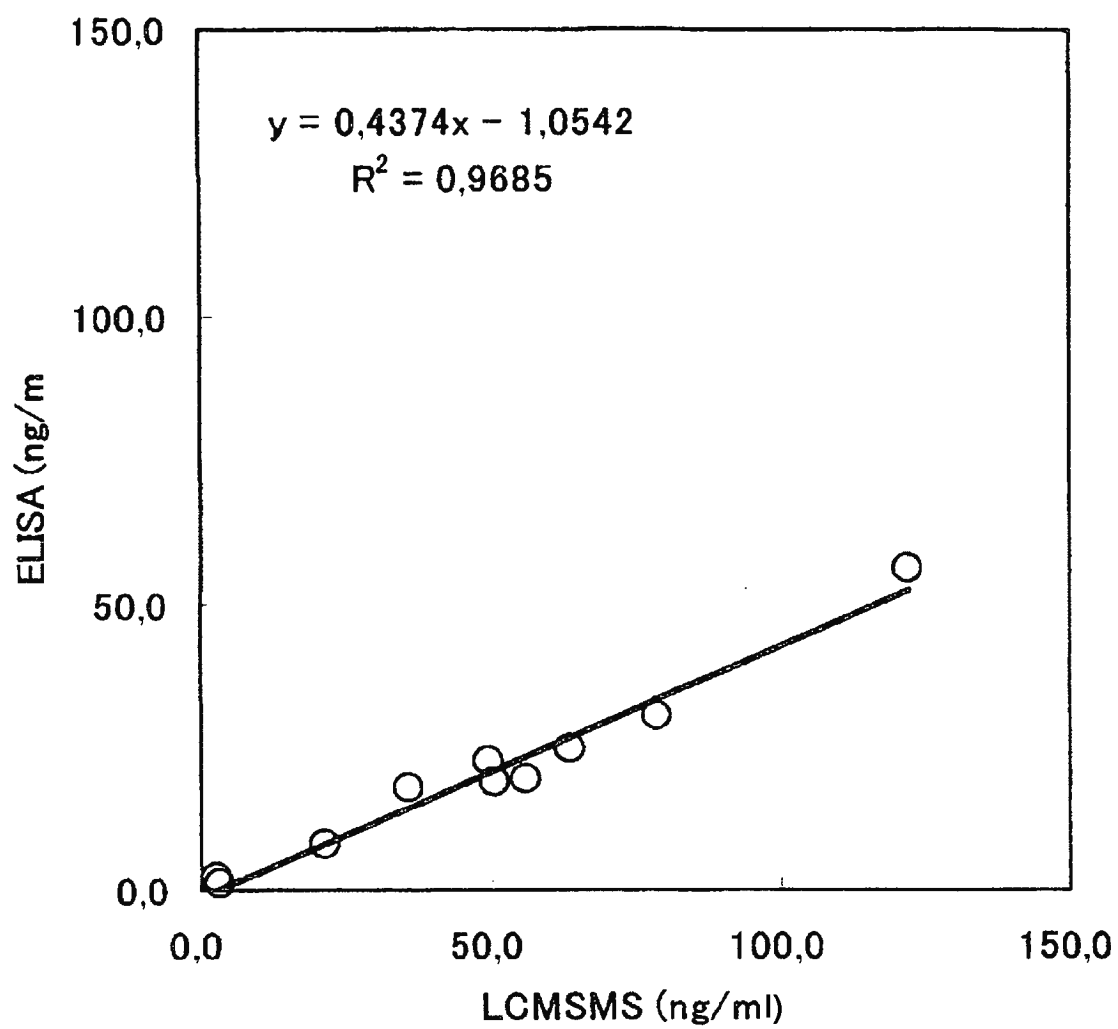


Fig. 7

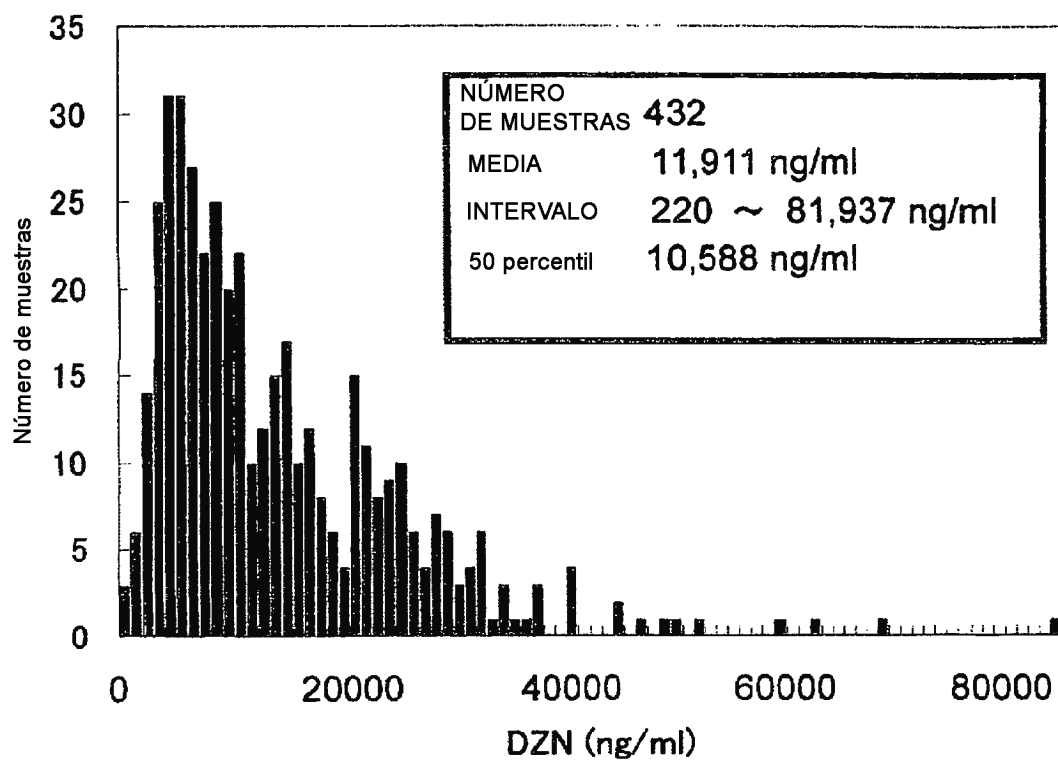


Fig. 8

