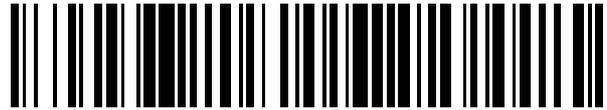


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 255**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2012 E 12720103 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2715349**

54 Título: **Ensayo de unión de elastasa unida a fase sólida para la medida de la actividad de alfa<sub>1</sub>-antitripsina**

30 Prioridad:

**26.05.2011 US 201161490553 P**

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

**16.06.2016**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)  
Thurgauerstrasse 130  
8152 Glattpark, Opfikon, CH y  
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WEBER, ALFRED;  
ENGELMAIER, ANDREA y  
SCHWARZ, HANS-PETER**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

**ES 2 574 255 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

Ensayo de unión de elastasa unida a fase sólida para la medida de la actividad de alfa<sub>1</sub>-antitripsina.

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un método para la medida del inhibidor de alfa<sub>1</sub>-proteínasa activo (A1PI) en una muestra, que incluye los pasos de unir elastasa a un soporte sólido, dejar que el A1PI contenido en la muestra se una a la elastasa unida a fase sólida y detectar el A1PI unido a fase sólida con un reactivo de detección.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El inhibidor de alfa<sub>1</sub>-proteínasa (A1PI; también: alfa-1-antitripsina) circula con valores séricos de 20 a 48 µM. La glicoproteína de 51 kDa consiste en 394 aminoácidos con tres N-glicanos de tipo complejo unidos a las asparaginas 46, 83 y 247. La ramificación diferente del N-glicano y el truncamiento N-terminal resultan en un patrón característico en un enfoque isoeléctrico. Además, recientemente se ha descrito una forma con truncamiento C-terminal de la A1PI que carece de la lisina C-terminal después de desdoblamiento mediante carboxipeptidasas básicas. La A1PI es un miembro de la superfamilia de las serpinas (*serine proteinase inhibitors* - inhibidores de la serina proteínasa). Su actividad antiproteasa requiere forzosamente el sitio activo Met358-Ser359. Este sitio ocupa un bucle expuesto en la molécula y se une firmemente a la región activa de la elastasa de neutrófilos o a otras serina proteasas, incluyendo tripsina, catépsina G, plasmina, trombina y calicreína tisular. La A1PI ejerce una función de inactivación preferencial para la elastasa de neutrófilos, ya que la constante de tasa de asociación para el complejo A1PI/elastasa de neutrófilos es 25 veces mayor que la medida para otras serina proteasas. La A1PI se difunde desde el plasma al pulmón, donde se encarga de más del 90% de la protección antielastasa del tracto respiratorio inferior. La deficiencia de A1PI, que conduce a concentraciones de plasma por debajo de 20 µM, deja el pulmón mal protegido y altamente vulnerable a una destrucción pulmonar progresiva. La terapia se dirige hacia la sustitución o el aumento de la A1PI plasmática.

15 La medición de la actividad de inhibición de la elastasa de neutrófilos de la A1PI ya se posibilitó básicamente en 1974, cuando se describió la síntesis del sustrato cromógeno N-succinil-L-alanil-L-alanil-L-alanin-p-nitroanilida (Suc(Ala)<sub>3</sub>-pNA). Este sustrato tiene una alta selectividad para la elastasa. Por ejemplo, la tripsina y la quimiotripsina tienen tasas de hidrólisis respectivas de 0,007 y 0,014 cuando se miden en la misma concentración que la elastasa, estableciendo la tasa obtenida con elastasa en 100. A un pH 8,0 y 25°C, el sustrato Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA tiene las constantes cinéticas K<sub>m</sub> y K<sub>cat</sub> de 1,15 mM y 18,6 s<sup>-1</sup> para elastasa, respectivamente. Su selectividad y buena solubilidad en agua eran la base para un ensayo de inhibición de elastasa por A1PI, tal como se describió por primera vez en 1981. Este ensayo se basaba en la medida de la actividad de elastasa residual de muestras de A1PI incubadas con un exceso de elastasa. En pocas palabras, las muestras se incubaron con una cantidad definida de elastasa porcina durante un tiempo determinado antes de añadir el sustrato cromógeno. La liberación de pNA se controló fotométricamente y permitió para calcular la actividad residual de elastasa, que a su vez es inversamente proporcional a la actividad de A1PI de la muestra. Los formatos de ensayo estándar que utilizan este método cromógeno tienen un límite de cuantificación relativamente alto, de aproximadamente 3 µg/ml de A1PI activo. Aunque la sensibilidad de estos formatos de ensayo se puede aumentar utilizando sustratos fluorogénicos para medir la elastasa residual, éstos siguen estando limitados por el hecho de que no se mide el producto de reacción, sino uno de los correactivos en exceso, es decir, la elastasa.

20 Por tanto, existe una gran necesidad de disponer de un nuevo ensayo para la determinación de la actividad de A1PI en una muestra que tenga una mayor sensibilidad.

Esta necesidad se satisface proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

## 40 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención describe el uso de elastasa unida a una fase sólida para medir la actividad de inhibición antielastasa de la A1PI en una muestra. Las cantidades de complejo elastasa-A1PI formado se miden directamente mediante la detección de A1PI unido a placa y en complejo con elastasa con un reactivo de detección, en lugar de medir la actividad de elastasa residual. Este modo de detección aumenta ventajosamente la sensibilidad del ensayo en un factor 1.000. La selectividad superior del ensayo depende de la especificidad de la formación del complejo elastasa-A1PI, que no cambia después de unir la elastasa a un soporte sólido, y de la especificidad del reactivo de detección utilizado.

50 En particular, la presente invención se refiere un método para medir el inhibidor de alfa<sub>1</sub>-proteínasa activo (A1PI) en una muestra, que incluye los pasos de unir elastasa a una fase sólida, incubar la fase sólida con la muestra, incubar la fase sólida con un reactivo de detección que se une específicamente a la A1PI, determinar la cantidad de reactivo de detección unido a la fase sólida y determinar la cantidad de A1PI activa en la muestra.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para medir el inhibidor de alfa<sub>1</sub>-proteínasa activo (A1PI) en una muestra, que incluye los pasos de

- (a) unir elastasa a una fase sólida;
- 5 (b) incubar la fase sólida con la muestra;
- (c) incubar la fase sólida con un reactivo de detección que se une a la A1PI;
- (d) determinar la cantidad de reactivo de detección unido a la fase sólida; y
- (e) determinar la cantidad de A1PI activa en la muestra.

10 En este contexto, el concepto "medida de la A1PI activa en una muestra" tal como se utiliza aquí se refiere a determinar la cantidad y/o la concentración de A1PI activa contenida en una muestra. Además, el concepto "A1PI activa" tal como se utiliza aquí se refiere a A1PI capaz de ejercer su función nativa, es decir, unirse a la elastasa y otras serina proteasas e inactivarlas.

15 La elastasa utilizada en el método de la presente invención no está sometida a ninguna limitación particular y puede ser, por ejemplo, elastasa humana o porcina. En la técnica se conocen medios para unir elastasa a una fase sólida, que no están sometidos a ninguna limitación particular. Estos incluyen, por ejemplo, la incubación del soporte sólido con elastasa en un tampón adecuado, por ejemplo solución tampón fosfato (PBS), durante un período de tiempo apropiado, por ejemplo una noche, a una temperatura apropiada, por ejemplo +4°C. En la técnica se conocen otros tampones y parámetros de incubación adecuados.

20 La fase sólida sobre la que se lleva a cabo el método de la presente invención no está sometida a ninguna limitación particular. Además, en la técnica se conocen fases sólidas adecuadas. En una realización preferente, la fase sólida es una microplaca, por ejemplo con una superficie absorbente tal como, por ejemplo, una placa NUNC™ Maxisorp.

En el contexto de la presente invención, la elastasa se puede unir a la fase sólida por adsorción, donde queda retenida por fuerzas hidrófobas. Alternativamente, la superficie de la fase sólida se puede activar mediante procesos químicos que producen un enlace covalente de la elastasa con el soporte.

25 Si la fase sólida es silicio o vidrio, en general la superficie se debe activar antes de unir la elastasa. Para introducir grupos reactivos, como grupos amino, vinilo y tiol, se pueden utilizar compuestos silano activados tales como trietoxiaminopropil-silano, trietoxivinilsilano y (3-mercaptopropil)trimetoxisilano, respectivamente. Estas superficies activadas se pueden utilizar para unir la elastasa directamente (en los casos del amino o el tiol), o la superficie activada se puede someter adicionalmente a una reacción con enlazantes como glutaraldehído, bis(succinimidil)suberato, SPPD (succinimidil 3-[2-piridilditio]propionato, SMCC (succinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato), SLAB (succinimidil [4-yodoacetil]aminobenzoato) y SMPB (succinimidil 4-[1-maleimidofenil]butirato), para separar la elastasa de la superficie. Los grupos vinilo se pueden oxidar para proporcionar un método de unión covalente. También se pueden utilizar grupos vinilo como un anclaje para la polimerización de diversos polímeros, como ácido poliacrílico, que puede proporcionar múltiples puntos de unión para la elastasa. Los grupos amino se pueden someter a reacción con dextranos oxidados de diversos pesos moleculares para proporcionar enlazantes hidrófilos de diferentes tamaños y capacidades. Ejemplos de dextranos oxidables incluyen Dextran T-40 (peso molecular 40.000 dalton), Dextran T-110 (peso molecular 110.000 dalton), Dextran T-500 (peso molecular 500.000 dalton), Dextran T-2M (peso molecular 2.000.000 dalton), o Ficoll (peso molecular 70.000 dalton). Adicionalmente se pueden utilizar interacciones polielectrolíticas para inmovilizar la elastasa sobre la fase sólida.

40 La fase sólida puede ser cualquier material adecuado con suficiente afinidad superficial para unirse a la elastasa. Los soportes sólidos útiles incluyen: carbohidratos poliméricos naturales y sus derivados modificados sintéticamente, reticulados o sustituidos, como agar, agarosa, ácido alginico reticulado, gomas guar sustituidas y reticuladas, ésteres de celulosa, en especial con ácido nítrico y ácidos carboxílicos, ésteres de celulosa mixtos y éteres de celulosa; polímeros naturales que contienen hidrógeno, como proteínas y derivados, incluyendo gelatinas reticuladas o modificadas; polímeros de hidrocarburo naturales, como látex y caucho; polímeros sintéticos, como polímeros vinílicos, incluyendo polietileno, polipropileno, poliestireno, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo y sus derivados parcialmente hidrolizados, poliacrilamidas, polimetacrilatos, copolímeros y terpolímeros de los policondensados arriba indicados, como poliésteres, poliamidas y otros polímeros, como poliuretanos o poliepóxidos; materiales inorgánicos tales como sulfatos o carbonatos de metales alcalinotérreos y magnesio, incluyendo sulfato de bario, sulfato de calcio, carbonato de calcio, silicatos de metales alcalinos y alcalinotérreos, aluminio y magnesio; y óxidos o hidratos de aluminio o silicio tales como arcillas, alúmina, talco, caolín, zeolita, gel de sílice o vidrio (esto materiales pueden ser utilizados como filtros con los materiales poliméricos arriba indicados); y mezclas o copolímeros de las clases arriba indicadas, como copolímeros de injerto obtenidos inicializando la polimerización de polímeros sintéticos sobre un polímero natural preexistente. También se puede utilizar nitrocelulosa y nylon. Todos estos materiales pueden ser utilizados en formas adecuadas,

como películas, láminas, tubos, particulados o placas, o se pueden aplicar, unir o laminar en soporte inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas de plástico, tejidos o similares.

5 Alternativamente, la fase sólida puede estar constituida por micropartículas. Las micropartículas apropiadas pueden seleccionarse por los expertos en la técnica de entre cualquier tipo adecuado de material particulado, incluyendo aquellos compuestos por poliestireno, polimetacrilato, polipropileno, látex, politetrafluoroetileno, poliácridonitrilo, policarbonato o materiales similares. Además, las micropartículas pueden ser micropartículas magnéticas o paramagnéticas para facilitar su manipulación dentro de un campo magnético.

10 Las micropartículas se pueden suspender en la mezcla de reactivos y muestra o se pueden retener e inmovilizar mediante un material de soporte. En este último caso, las micropartículas sobre o en el material de soporte no pueden realizar ningún movimiento sustancial a posiciones en otro lugar dentro del material de soporte. Alternativamente, las micropartículas se pueden separar de la suspensión en la mezcla de reactivos y muestra por sedimentación o centrifugación. Cuando las micropartículas son magnéticas o paramagnéticas, las micropartículas se pueden separar de la suspensión en la mezcla de reactivos y muestra con un campo magnético.

15 La incubación de la fase sólida con la muestra de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo a temperaturas adecuadas durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los expertos en la técnica conocen otras combinaciones tiempo/temperatura adecuadas.

20 En una realización preferente, la fase sólida se bloquea antes de incubar la fase sólida con la muestra en el paso (b) con el fin de disminuir la adsorción no específica de la A1PI u otros componentes de mezcla en la fase sólida. En la técnica se conocen agentes bloqueantes adecuados, no estando sometidos a ninguna limitación particular. Éstos incluyen, por ejemplo, seroalbúmina bovina (BSA), BSA metilada, seroalbúmina humana, caseína, caseína hidrolizada, leche desnatada evaporada, gelatina o leche en polvo, en tampones adecuados. Un tampón de bloqueo adecuado es, por ejemplo, un PBS que contiene un 0,05% de polisorbato 20 y 10 mg/ml de BSA. El bloqueo se puede llevar a cabo a temperaturas adecuadas durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los expertos en la técnica conocen otras combinaciones tiempo/temperatura adecuadas.

25 En otra realización preferente, la muestra se diluye antes de la incubación con la fase sólida en el paso (b). Las proporciones de dilución adecuadas dependen de la concentración de la A1PI prevista en la muestra y son conocidas por los expertos en la técnica. Además, en la técnica se conocen tampones de dilución adecuados, no estando sometidos a ninguna limitación particular. Éstos incluyen, por ejemplo, PBS.

30 En la técnica se conocen reactivos de detección adecuados que pueden emplearse en el método de la presente invención, no estando éstos sometidos a ninguna limitación particular. Éstos incluyen, por ejemplo, compuestos, composiciones o moléculas capaces de unirse específicamente o de forma esencialmente específica (es decir, con una reactividad cruzada limitada) a un epítipo de A1PI. Estos agentes (o ligandos) son normalmente anticuerpos, como anticuerpos monoclonales, o derivados o análogos de los mismos, pero también incluyen, sin limitación: fragmentos Fv; fragmentos Fv de cadena sencilla (*single chain Fv* - scFv); fragmentos Fab'; fragmentos F(ab')<sub>2</sub>; anticuerpos y fragmentos de anticuerpo humanizados; anticuerpos y fragmentos de anticuerpo camelizados; anticuerpos quiméricos; y versiones multivalentes de los agentes arriba mencionados. También se pueden utilizar de forma apropiada agentes de captura multivalentes, incluyendo, sin limitación: anticuerpos mono-específicos o biespecíficos tales como fragmentos Fv estabilizados con disulfuro. Estos agentes también incluyen, sin limitación, aptámeros, péptidos sintéticos, moléculas de unión, ácidos nucleicos, etc., tal como se conocen en la técnica. Los marcadores adecuados para los reactivos de detección a utilizar en el método de la presente invención no están sometidos a ninguna limitación particular y son conocidos en la técnica. Éstos incluyen, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa alcalina, biotina y moléculas fluorescentes. En una realización preferente, el reactivo de detección es un anticuerpo A1PI antihumano conjugado con peroxidasa.

45 La incubación de la fase sólida con un reactivo de detección se puede llevar a cabo a temperaturas adecuadas durante un período de tiempo adecuado, por ejemplo durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los expertos en la técnica conocen otras combinaciones tiempo/temperatura adecuadas. Además, en la técnica se conocen y se pueden determinar fácilmente las proporciones de dilución y los tampones adecuados para diluir el reactivo de detección antes de la incubación.

50 En una realización preferente, la fase sólida se lava antes y después de la incubación de la fase sólida con el reactivo de detección en el paso (c). En la técnica se conocen tampones de lavado adecuados y éstos no están sometidos a ninguna limitación particular. Éstos incluyen, por ejemplo, un PBS que contiene un 0,05% de polisorbato 20.

55 En la técnica se conocen medios para determinar la cantidad de reactivo de detección unido a la fase sólida adecuados y éstos no están sometidos a ninguna limitación particular. En el caso de los conjugados de anticuerpo marcados con peroxidasa, dichos medios incluyen, por ejemplo, la incubación de la fase sólida con un sustrato de peroxidasa cromógeno adecuado, por ejemplo el reactivo trimetilbencidina peroxidasa listo para el uso SureBlue (KPL), a una temperatura adecuada, por ejemplo a temperatura ambiente, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de color. A continuación, la formación de color se puede detener, por ejemplo por adición de ácido sulfúrico

1,5M, y la cantidad de color generado se puede determinar, por ejemplo en un lector ELISA a 450 nm. Los expertos en la técnica conocen otros sustratos cromógenos, tiempos y temperaturas de incubación adecuados, y medios para medir la cantidad de color formado. En el contexto de la presente invención también se puede emplear un sistema de amplificación utilizado comúnmente en la técnica, incluyendo el sistema de biotina-avidina.

- 5 Por último, en la técnica se conocen medios para determinar la cantidad de A1PI activo en la muestra, y éstos no están sometidos a ninguna limitación particular. Éstos incluyen, por ejemplo, la correlación de datos de muestra con una curva de calibración adecuada establecida, por ejemplo, utilizando concentraciones de A1PI conocidas.

En las figuras:

- 10 Figura 1: muestra una curva de calibración de 6 puntos representativa obtenida como el promedio de tres curvas preparadas en un día.
- Figura 2: muestra las curvas dosis-respuesta de dos preparaciones de A1PI de diferente pureza.
- Figura 3: muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida de una preparación de A1PI agregado.
- Figura 4: muestra una cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento de una preparación de A1PI agregado.
- 15 Figura 5: muestra la correlación entre los niveles de monómero de A1PI, determinados con HP-SEC y los resultados de dos ensayos de actividad diferentes medidos en relación con las muestras con diferentes concentraciones de agregados de A1PI.
- Figura 6: muestra la curva de regresión obtenida representando en un gráfico los resultados de dos ensayos de actividad diferentes.
- 20 Figura 7: muestra las curvas concentración-respuesta obtenidas con el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida para un concentrado de A1PI purificado, una preparación de plasma de referencia humano y una preparación de A1PI oxidado.
- Figura 8: muestra la formación de complejo de elastasa con inhibidores de proteínas plasmáticas. El gráfico insertado indica las intensidades de señal relativas determinadas para los diferentes inhibidores y las  
25 cuatro diluciones indicadas como porcentaje de la dilución medida en el caso del A1PI.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos, sin limitarla en modo alguno a los mismos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Preparación y características de una curva de calibración de ensayo de 6 puntos

- 30 La curva de calibración de ensayo consistente en seis diluciones en serie 1+1 de una preparación estándar de trabajo cubría un intervalo de concentración de actividad de A1PI entre 110 ng/ml y 3,5 ng/ml. La curva se obtuvo de la siguiente manera:

- 35 Una elastasa porcina (Roche, 11027905001; 50 mg/ml) se diluyó a 50 µg/ml con una solución salina tampón fosfato (PBS; 8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,26 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·x2 H<sub>2</sub>O; pH nativo) y se incubó en los pocillos de una placa NUNC Maxisorp F96 a 4°C durante una noche (100 ml/pocillo). La placa se lavó después con un PBS que contenía un 0,05% de polisorbato 20 (tampón de lavado, TL) y se inactivó por incubación con 200 µl/pocillo de tampón de lavado que contenía 10 mg/ml de seroalbúmina bovina (tampón de dilución; TD) a 37°C durante 60 minutos. Después se añadieron a los pocillos 100 µl/pocillo de tampón de dilución y los pocillos estándar prediluidos, de control o muestras se cargaron y se diluyeron en serie directamente sobre la placa. Los pocillos B11 y B12 contenían únicamente tampón de dilución y sirvieron como ensayos en blanco. La placa se incubó después a temperatura ambiente (TA; 20 a 40 25°C) durante 60 minutos y después se lavó. A continuación, se aplicó a los pocillos peroxidasa A1PI antihumana de oveja (El Sitio de Unión), diluida 1/1.000 en TD, a razón de 100 µl/pocillo, se incubó a TA durante 60 minutos y se retiró mediante un paso de lavado. La placa lavada se lavó después con el reactivo de trimetilbencidina peroxidasa listo para el uso SureBlue (KPL; 100 µl/pocillo) y se incubó a TA hasta que se desarrolló el color apropiado. La reacción se interrumpió después con 100 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1,5M. Después, en un plazo de 60 minutos, la placa se midió  
45 en un lector ELISA a 450 nm con una medida de referencia a 620 nm.

- La preparación estándar utilizada para la calibración del ensayo era una preparación de A1PI purificado, calibrada con un ensayo cromógeno de inhibición de elastasa validado en relación con la norma de la OMS actual para A1PI. Por tanto, la concentración asignada a este patrón de trabajo era de 22,1 mg de A1PI activo por ml. La serie de diluciones final, preparada por duplicado, consistía en seis diluciones 1/200.000 a 1/6.400.000, que daban como resultado un  
50 intervalo de actividad de A1PI de 110 ng/ml a 3,5 ng/ml. La curva de calibración se obtuvo finalmente utilizando un

ajuste logarítmico de las densidades ópticas (DO) medidas corregidas con ensayo en blanco y las concentraciones de actividad de A1PI de los calibradores de ensayo.

5 La Figura 1 muestra una curva de calibración de 6 puntos representativa obtenida como promedio de tres curvas preparadas en un día. Las características de pendiente de la curva de calibración, ordenada en el origen y coeficiente de correlación eran muy similares en las tres curvas promediadas. Esto también era aplicable a la exactitud y precisión de las curvas. Las curvas de calibración cumplían los requisitos aceptados de exactitud, precisión y linealidad y, por tanto, se consideraron apropiadas para la extrapolación de muestras. El rango de relación lineal entre la señal y la concentración de actividad de A1PI bajó a 3,5 ng/ml. Por consiguiente, el ensayo era 1.000 veces más sensible que el ensayo cromógeno de inhibición de elastasa estándar basado en la medida de la actividad de elastasa residual.

#### 10 **Ejemplo 2: Medida de la actividad de A1PI de plasma humano**

El plasma contiene otros inhibidores de proteinasa diversos aparte del A1PI que teóricamente podrían interactuar con la elastasa. No obstante, se ha informado de que la asociación constante del complejo A1PI-elastasa es aproximadamente 25 veces mayor que la medida en otros inhibidores de proteinasa. Por tanto, la A1PI ejerce un efecto inhibidor preferencial de la elastasa.

15 No obstante se compararon las curvas dosis-respuesta de una preparación de A1PI purificada, utilizada como patrón de ensayo, y una preparación de plasma de referencia humano. La última preparación se midió en una serie de diluciones que incluía las seis diluciones en serie 1+1 1/20.000 a 1/640.000. La Figura 2 muestra las curvas dosis-respuesta correspondientes a las dos preparaciones de diferente pureza. Las dos curvas dosis-respuesta eran muy similares, tal como muestran sus pendientes, que diferían en menos de un 0,5%. Este resultado demuestra que la inmovilización de la elastasa en el soporte sólido no modificó su selectividad para la unión con A1PI.

#### 20 **Ejemplo 3: Medida de muestras que contienen A1PI agregada**

25 Se obtuvo una preparación de A1PI agregada calentando una solución de A1PI purificada con una concentración de 20 mg/ml a 60°C durante 15 minutos. Esta solución se mezcló después con A1PI nativa en diferentes proporciones. Se prepararon varias mezclas que contenían del 10 al 90% de A1PI agregada en A1PI nativa y se analizaron junto con la A1PI nativa y la agregada por calor por electroforesis en gel de poliacrilamida nativa (*polyacrylamide gel electrophoresis* - PAGE; véase la Figura 3) y por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (*high-performance size-exclusion chromatography* - HP-SEC; véase la Figura 4).

30 Los números sobre la parte superior del gel mostrados en la Figura 3, que indican las diferentes muestras, señalan los niveles relativos de A1PI agregada por calor en las mezclas en forma de porcentaje, mientras que el asterisco marca la banda correspondiente al monómero de A1PI. Las muestras, cargadas con la misma concentración de proteína y teñidas con Coomassie, difieren obviamente en la intensidad de la banda de monómero de A1PI, que es inversamente proporcional a los niveles relativos de A1PI agregada por calor en las muestras. Por otro lado, los compuestos de muestra de alto peso molecular aumentan con los niveles relativos de A1PI agregada por calor en las mezclas. Por tanto, la PAGE nativa confirma claramente la agregación de A1PI inducida por calor. Este resultado también se confirmó en los datos de los análisis por HP-SEC, en los que los niveles relativos más altos de A1PI agregada por calor en las mezclas estaban en correlación con áreas pico relativas más altas del pico agregado y áreas de pico relativas más bajas del monómero de A1PI.

35 La figura 5 muestra la correlación entre los niveles de monómero de A1PI, determinados con HP-SEC y los resultados de los dos ensayos de actividad medidos para las muestras con diferentes concentraciones de agregados de A1PI. La actividad de A1PI de estas muestras se midió utilizando el ensayo cromógeno de inhibición de elastasa y el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención. La actividad de A1PI, medida con el ensayo cromógeno de inhibición de elastasa, estaba claramente en correlación con los niveles relativos de monómeros de A1PI, tal como muestra el coeficiente de correlación al cuadrado de  $R^2 = 0,9932$  hallado para la curva de regresión. Esto era de esperar, ya que la formación de agregados de A1PI implica predominantemente el sitio activo de A1PI, absolutamente obligatorio para su actividad inhibidora. La misma buena correlación se encontró cuando se utilizó el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención para medir la actividad de A1PI de las muestras. Además, las dos curvas de regresión presentaban pendientes similares, que solo diferían en un 1%.

40 Estos datos confirmaban que el ensayo de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención medía la actividad de inhibición de elastasa de la A1PI. Además, demostraba que incluso altas concentraciones de A1PI inactiva agregada no interferían en el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención. Estos datos demuestran claramente que el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida sólo mide la A1PI activa, es decir, capaz de inhibir la elastasa.

**Ejemplo 4: Correlación entre el ensayo cromógeno de inhibición de elastasa y el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida**

Se ensayaron unas muestras de A1PI que contenían niveles crecientes definidos de A1PI agregada por calor con el ensayo cromógeno de inhibición de elastasa, que se basa en incubar las muestras de A1PI con un exceso de elastasa porcina y medir la actividad de elastasa residual con el sustrato cromógeno Suc-{Ala}<sub>3</sub>-pNA. La elastasa divide el sustrato cromógeno y libera pNA, que se mide por fotometría. La densidad óptica es directamente proporcional a la concentración de elastasa, que es a su vez inversamente proporcional a la actividad de A1PI dentro de intervalos definidos. Además, estas muestras se midieron con el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención. La Figura 6 muestra la curva de regresión obtenida mostrando en un gráfico los resultados de dos ensayos de actividad diferentes.

Las concentraciones de actividad de A1PI medidas con los dos ensayos presentaban una buena correlación en el intervalo de actividad investigado, en concreto de 2 a 10 mg de A1PI activa/ml, tal como demuestra el coeficiente de correlación al cuadrado, de  $R^2 = 0,98$ . Estos datos demuestran la equivalencia de la actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención con el ensayo cromógeno de inhibición de elastasa, ya que las diferencias en las concentraciones de A1PI medidas en las muestras investigadas reflejaban más bien una varianza analítica aleatoria que una varianza sistemática. Los dos ensayos miden específicamente la A1PI activa. En particular se comprobó que concentraciones 10 veces mayores de A1PI inactiva no interfieren en ninguno de los dos ensayos.

**Ejemplo 5: Medida de A1PI oxidada**

La actividad inhibidora de proteinasa A1PI requiere forzosamente el sitio activo Met358-Ser359. Este sitio ocupa un bucle expuesto en la molécula y se une firmemente a la región activa de la elastasa de neutrófilo. El sitio Met358 es sensible a la oxidación, lo que resulta en una inactivación de la A1PI, que a su vez resulta en una pérdida de su actividad inhibidora de elastasa.

La especificidad del ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención se demostró midiendo la A1PI oxidada obtenida mediante el procedimiento indicado a continuación. En pocas palabras, 1,5 ml de una preparación de A1PI purificada completamente activa, con una concentración de A1PI de 20 mg/ml, se diluyeron con 13,5 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 5,0, que contenía KCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM. Después se añadieron 5,1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para provocar la oxidación. Esta mezcla de reacción se incubó a TA durante 2 horas y después se dializó contra solución salina tampón fosfato a 4°C durante una noche. Luego se prepararon partes alícuotas y se almacenaron congeladas a -20°C. La Tabla 1 indica los resultados de los análisis realizados. En particular, la proteína A1PI se midió con un ELISA. Además, la actividad de A1PI se midió con un ensayo cromógeno de inhibición de elastasa y el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a placa de la presente invención.

Tabla 1: Análisis de la preparación de A1PI oxidado

Muestra	Proteína (mg/ml)	Ensayo cromógeno de inhibición de elastasa		Ensayo de elastasa unida a fase sólida	
		mg/ml	< 0,6	mg/ml	%
A1PI oxidada	1,55	< 0,009	< 0,6	0,003	0,2

La medida de la proteína A1PI con ELISA resultó en una concentración de proteína A1PI de 1,55 mg/ml, que concordaba bien con lo esperado si se tiene en cuenta la dilución producida por el procedimiento. En cambio, el ensayo cromógeno de inhibición de elastasa no detectó A1PI activa y se midió una concentración menor de 0,009 mg/ml de la A1PI oxidada. Esto corresponde a menos de un 0,6% de la actividad inicial. Estos datos son conformes con los resultados del ensayo de elastasa unida a fase sólida de la presente invención, en el que únicamente se comprobó un 0,2% de la actividad inicial de esta preparación. En conjunto, estos datos también demuestran que la especificidad del ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención era similar a la del ensayo cromógeno de inhibición de elastasa. La A1PI oxidada, que seguía siendo inmunorreactiva tal como muestran los datos del ELISA, no presentaba ninguna actividad considerable independientemente de que se midiera con el ensayo cromógeno de elastasa o con el ensayo de elastasa unido a fase sólida. La Figura 7 muestra las curvas concentración-respuesta obtenidas con el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida para un concentrado de A1PI purificado, una preparación de plasma de referencia humano y la preparación de A1PI oxidada. Las curvas concentración-respuesta demuestran claramente que el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención sólo mide A1PI activa, ya que la A1PI oxidada sólo daba señales muy bajas, que podrían indicar la presencia de niveles bajos de A1PI todavía nativa.

**Ejemplo 6: Medida de complejos de elastasa-A1PI**

La inhibición de elastasa por A1PI resulta en la formación de un complejo A1PI-elastasa estable y la A1PI pierde su actividad inhibidora después de haberse unido a elastasa. Por consiguiente, no se deberían detectar complejos de A1PI

elastasa o éstos no deberían interferir con un ensayo de actividad de A1PI. Así, se incubó una preparación de A1PI purificada con diferentes cantidades de una preparación de elastasa humana purificada para obtener muestras que contenían diferentes niveles de complejos de A1PI-elastasa.

5 En pocas palabras, una preparación de A1PI purificada se diluyó con Tris-HCl 20 mM, pH 8,2, que contenía 10 mg/ml de seroalbúmina humana, a una concentración de 400 µg/ml y se incubó con una preparación de elastasa de neutrófilo humana (ICN, 191337; 500 µg/ml) en diferentes proporciones molares a TA durante 45 minutos. En particular se prepararon y analizaron muestras con relaciones molares A1PI:de 1:0,26, 1:0,52, 1:1,02 y 1:2,55. La Tabla 2 muestra los resultados de la medida de la actividad de A1PI con el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención.

10 Tabla 2:Ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de muestras que contienen complejo de A1PI-elastasa

Muestra	Relación molar A1PI:elastasa	Ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida	
		mg/ml	% inicial
1	1:0,00	20,1	100,0
5	1:0,26	15,4	76,6
4	1:0,51	10,7	53,2
3	1:1,02	< 0,6	< 3
2	1:2,55	< 0,6	< 3

15 La incubación de la preparación de A1PI con concentraciones crecientes de elastasa de neutrófilo redujo la actividad de A1PI medida con el ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención. La mezcla que contenía una concentración equimolar de A1PI y elastasa no mostraba ninguna actividad mensurable. En cambio, las muestras con relaciones molares A1PI:elastasa de 1:0,51 y 1:0,26 seguían teniendo actividad de A1PI con concentraciones correspondientes al 53,2% y el 76,6% con respecto a la medida en la muestra antes de la formación de complejos. Esto se correspondía estrechamente con la pérdida de actividad prevista inducida por los niveles de elastasa añadida. Estos resultados también demostraban la capacidad del ensayo de actividad de A1PI de elastasa unida a fase sólida de la presente invención para medir la actividad de inhibición de elastasa de A1PI.

**Ejemplo 7: Actividad amidolítica de elastasa unida a placa**

25 El método de la presente invención depende de la formación de complejos entre la elastasa unida a placa y la A1PI. Por ello es necesario que la elastasa unida a placa mantenga su actividad, ya que únicamente la enzima activa atacará el bucle de centro reactivo de la A1PI conduciendo a la formación de complejos. El sustrato cromógeno Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA se utilizó para medir la solución de elastasa después del procedimiento de revestimiento y para comprobar la presencia de elastasa activa en los pocillos revestidos de la microplaca. De este modo se midió una actividad de elastasa de 18,8 µg/ml en la solución recuperada después del procedimiento de revestimiento. La diferencia con la concentración antes del revestimiento (20 µg/ml) significaba 120 ng de elastasa unida en cada pocillo, lo que corresponde a una densidad de 30 1,3 ng de elastasa por mm<sup>2</sup>. Una estimación razonable de la adsorción superficial de IgG es de 0,4 ng por mm<sup>2</sup>. Cuando se añadió sustrato cromógeno a los pocillos revestidos y lavados, se comprobó que todos los pocillos presentaban una actividad de elastasa que condujo a la hidrólisis del sustrato cromógeno. Estos datos confirmaron que la formación de complejos observada después de la incubación con A1PI se basaba realmente en el ataque proteolítico de la elastasa. Cuando después se extrapolaron las DO corregidas con ensayo en blanco en una curva de calibración obtenida por medición de la elastasa libre, se comprobó una actividad de elastasa de 82,3 ng por pocillo. Esto significa que más de 35 un 50% de la elastasa seguía activa después del procedimiento de revestimiento.

**Ejemplo 8: Formación de complejos con otros inhibidores**

40 El plasma humano contiene diversas proteínas que pueden formar complejos con elastasa. Aunque la constante de tasa de la formación de complejos entre A1PI y elastasa es 25 veces mayor que la medida en el caso de otras serina proteasas, se investigó si la presencia de estos otros inhibidores influía o no en la medida de A1PI. Sin embargo, las curvas dosis-respuesta obtenidas de plasma y preparaciones de A1PI purificada no indicaban ningún efecto de estos inhibidores, ya que sus inclinaciones eran similares. En particular se comprobaron α<sub>1</sub>-antiquimiotripsina (ACh), α<sub>2</sub>-antiplasmina (AP), antitrombina (AT), α<sub>2</sub>-macroglobulina (AM), inhibidor C1 (C1-inh) e inhibidor de inter-α-tripsina (ITI) en cuanto a su capacidad para formar cantidades esenciales de complejos con la elastasa unida a placa y así influir en 45 la medida de A1PI. Como control negativo adicional, el nivel de unión no específica con los pocillos se determinó con elastasa unida a placa utilizando IgG como proteína marcadora no específica, mientras que la unión de A1PI se utilizó como referencia positiva. La Tabla 3 muestra las DO corregidas con ensayo en blanco medidas para las series de diluciones de la preparación de plasma humano de referencia 1R31003. Estas series de diluciones, que incluían doce diluciones entre 1/100 y 1/204.800, se incubaron con la elastasa unida a placa. Después se detectaron los complejos 50 potencialmente formados utilizando conjugados de peroxidasa de anticuerpo específicos para los respectivos

inhibidores. Estos datos también se muestran en la Figura 8, en la que se comparan directamente las curvas de dilución frente a DO.

Tabla 3: Formación de complejos de elastasa con inhibidores de proteína de plasma

Dilución	A1PI	ACh	AP	AT	AM	C1-inh	ITI	IgG
100	2,214	0,151	0,111	0,016	0,150	0,027	0,000	0,210
200	2,121	0,107	0,038	0,008	0,137	0,005	0,000	0,113
400	1,839	0,086	0,000	0,003	0,129	0,000	0,000	0,058
800	1,614	0,072	0,000	0,0014	0,119	0,000	0,000	0,030
1600	1,385	0,062	0,000	0,000	0,104	0,000	0,000	0,011
3200	1,203	0,044	0,000	0,002	0,092	0,000	0,000	0,002
6400	0,959	0,058	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000
12800	0,779	0,029	0,000	0,004	0,059	0,000	0,000	0,000
25600	0,567	0,017	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000
51200	0,391	0,017	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000
102400	0,239	0,012	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000
204800	0,141	0,005	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000

5 Los datos demuestran claramente que el A1PI forma un complejo con elastasa más fácilmente que cualquiera de los otros inhibidores investigados. No obstante, se detectó una formación de complejos moderada en dos de los seis inhibidores ensayados: únicamente los inhibidores  $\alpha_2$ -macroglobulina y  $\alpha_1$ -antiquimiotripsina mostraban una formación mensurable de un complejo de elastasa con señales medias que constituían hasta un 6,0% y un 3,9% de la formación medida en el caso de la formación de complejos con A1PI. En particular se calculó la media de las diluciones 1/12.800 a 10 1/102.400 para evaluar mejor las señales obtenidas de los diferentes inhibidores. Estos datos sugieren que más de un 90% de la elastasa unida a placa estaba formando complejos con A1PI en el supuesto de la posibilidad de una comparación directa utilizando el método aquí seguido. Únicamente cantidades menores de los otros inhibidores de 15 proteinasa de plasma podían competir con la A1PI por la unión con la elastasa unida a placa. Estos datos se corresponden con las curvas dilución-respuesta determinadas en muestras de plasma y preparaciones de A1PI purificada. Estas curvas eran paralelas y no diferían de forma evidente en sus pendientes. En cambio, es de suponer que una competición efectiva por la elastasa unida a placa causada por inhibidores diferentes de la A1PI reduciría la concentración de elastasa disponible para la reacción con A1PI. En consecuencia, esto debería conducir a pendientes diferentes de las curvas concentración-respuesta dependiendo de la pureza de la preparación investigada. En un 20 segundo método se investigó más detalladamente la influencia de la AM. Para ello, se prepararon mezclas de A1PI purificado y AM que contenían una concentración constante de A1PI de 192 ng/ml y concentraciones crecientes de AM desde 0 hasta 2.000 ng/ml. Después se llevó a cabo el método de la presente invención con estas muestras y se compararon las curvas concentración-respuesta obtenidas. La Tabla 4 muestra las DO corregidas con ensayo en blanco de las series de diluciones, que se utilizaron para calcular las curvas de regresión logarítmicas. Estas curvas se describen adicionalmente por sus pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes de correlación. Las pendientes 25 también se indican como un porcentaje de las medidas en el caso de la muestra que no contenía AM.

Tabla 4: Análisis de mezclas de A1PI purificado y AM

A1PI ng/ml	Concentración de AM (ng/ml)						
	2000	1000	400	200	100	20	0
192,0	0,887	0,924	0,986	0,999	0,995	1,003	0,948
96,0	0,593	0,587	0,621	0,622	0,627	0,637	0,639
48,0	0,369	0,373	0,411	0,402	0,398	0,392	0,377
24,0	0,225	0,223	0,245	0,231	0,237	0,231	0,224
12,0	0,129	0,120	0,130	0,129	0,129	0,127	0,122
a	0,6974	0,7292	0,7188	0,7336	0,7300	0,7438	0,7430
b	-1,6231	-1,6805	-1,6280	-1,6594	-1,6516	-1,6781	-1,6904
r	0,9983	0,9975	0,9966	0,9982	0,9981	0,9985	0,9975
% pte.	93,9	98,2	96,7	98,7	98,2	100,1	100,0

30 Las curvas concentración-respuesta sólo presentaban una ligera influencia por el aumento de la concentración de AM de las mezclas, ya que sus inclinaciones diferían en menos de un 7% con respecto a la pendiente obtenida en la muestra que no contenía nada de AM. No obstante, sí se produjo formación de complejos entre AM y elastasa, pero la cantidad de complejos formados parecía no interferir en la medida de A1PI. Una masa de AM diez veces mayor que la de la A1PI resultó en concentraciones aproximadamente equimolares, pero para una estimación correcta de las 35 proporciones molares se ha de tener en cuenta que la AM contiene cuatro sitios inhibidores activos y que posiblemente más de un sitio podría intervenir en la unión con la elastasa inmovilizada en placa. Esta interacción también se puede producir durante el ensayo cromógeno, en el que la elastasa unida a AM sigue siendo activa cuando se mide con un sustrato cromógeno, contribuyendo así a una subestimación de la actividad de la A1PI medida en una muestra dada. En

este caso, la inactivación de AM con metilamina podría mejorar la situación. No obstante, los datos obtenidos en relación con el método de la presente invención demostraban que la pureza de las muestras no influye en la medida de la A1PI funcionalmente activa, incluso en caso de una concentración equimolar de AM.

#### Ejemplo 9: Precisión y exactitud del método de la presente invención

5 La exactitud y la precisión del método de la presente invención se determinaron en dos matrices de muestra. En primer lugar, se prepararon muestras que imitaban soluciones de lavado broncoalveolar (*bronchoalveolar lavage* - BAL) con una baja concentración total de proteínas, no superior a 50 µg/ml, con concentraciones de A1PI funcionalmente activa entre 0,0002 y 0,01 mg/ml. Después se obtuvieron muestras de tipo plasma con concentraciones de A1PI entre 0,01 y 0,8 mg/ml diluyendo una preparación de plasma humano de referencia con seroalbúmina humana, mientras que la muestra con la concentración de 3 mg/ml se obtuvo añadiendo A1PI purificado. Finalmente, también se incluyó el primer estándar actual de la OMS para A1PI, con el código 05/162. La exactitud se expresó como la recuperación de la concentración de A1PI nominal indicada como porcentaje y la precisión como la desviación estándar negativa de la media de seis mediciones, realizadas en un día (intraensayo) o en seis días (interensayo). Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 5.

15 Tabla 5: Precisión y exactitud del método de la presente invención en un intervalo de 0,0002 a 12,4 mg/ml de A1PI funcionalmente activo

A1PI mg/ml	Exactitud % recuperación	Precisión		Matriz de muestra
		intraensayo	interensayo	
0,0002	85,0	2,4	3,7	Muestra imitación BAL
0,0005	92,8	n.r.	3,5	Muestra imitación BAL
0,001	95,0	n.r.	4,3	Muestra imitación BAL
0,002	98,4	n.r.	8,4	Muestra imitación BAL
0,005	106,8	n.r.	3,2	Muestra imitación BAL
0,01	107,4	1,4	4,1	Muestra imitación BAL
0,01	106,0	3,1	6,1	Tipo plasma
0,10	104,7	2,6	7,5	Tipo plasma
0,20	98,9	4,2	4,5	Tipo plasma
0,50	104,9	2,0	7,0	Tipo plasma
0,80	102,5	2,9	6,8	Tipo plasma
1,00	n.r.	3,1	8,2	Tipo plasma
3,00	94,0	3,1	5,5	Tipo plasma
12,4	100,1	n.r.	8,6	Norma OMS 05/162

n.r.: no realizado; BAL: lavado broncoalveolar

**REIVINDICACIONES**

1. Método para la medida del inhibidor de alfa<sub>1</sub>-proteínasa activo (A1PI) en una muestra, que incluye los pasos de
  - (a) unir elastasa a una fase sólida;
  - (b) incubar la fase sólida con la muestra;
  - 5 (c) incubar la fase sólida con un reactivo de detección que se une a A1PI;
  - (d) determinar la cantidad de reactivo de detección unido a la fase sólida; y
  - (e) determinar la cantidad de A1PI activa en la muestra.
2. Método según la reivindicación 1, que además comprende el paso de bloquear la fase sólida con seroalbúmina bovina antes del paso (b).
- 10 3. Método según la reivindicación 1, que además comprende el paso de diluir la muestra antes de la incubación con la fase sólida en el paso (b).
4. Método según la reivindicación 1, que además comprende pasos de lavado de la fase sólida antes y después del paso (c).
5. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la elastasa es elastasa porcina.
- 15 6. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la fase sólida es una microplaca.
7. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo de detección es un anticuerpo A1PI antihumano conjugado con peroxidasa.

Figura 1

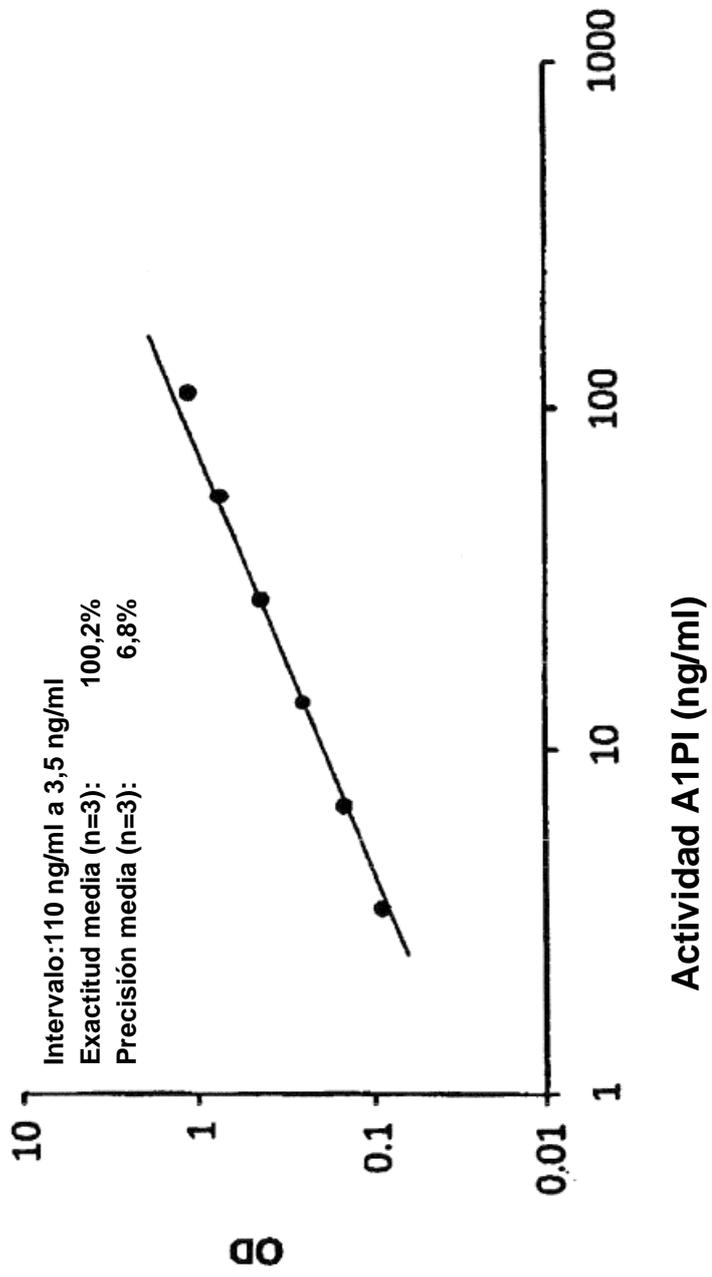
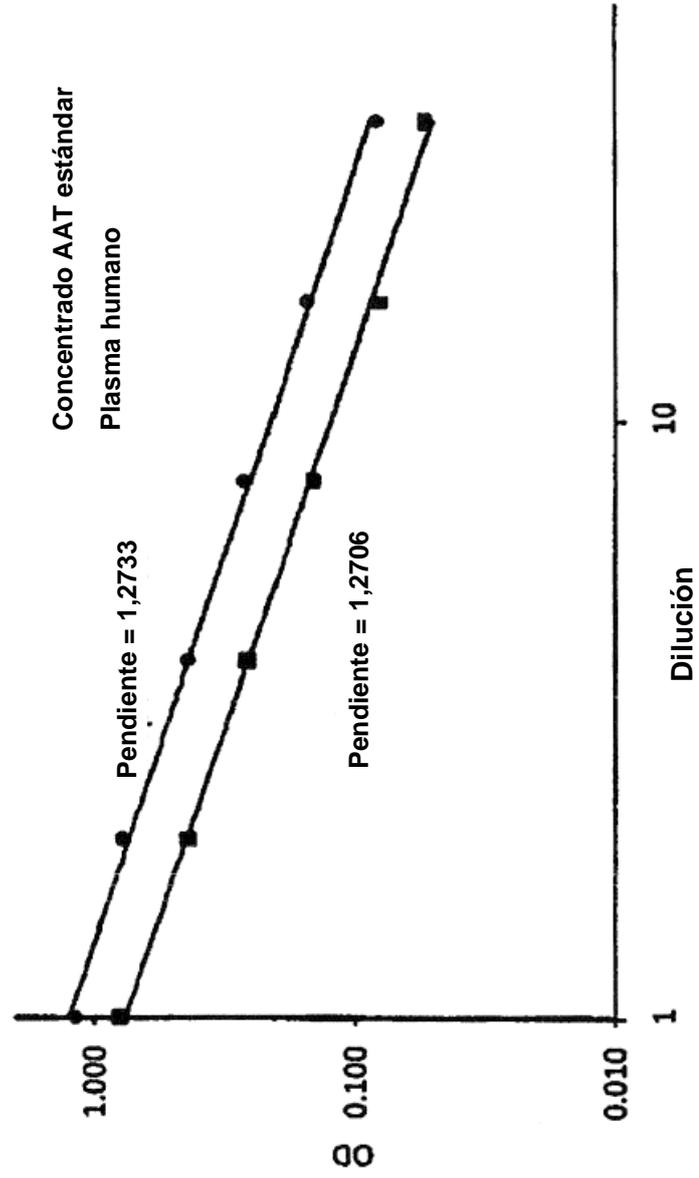


Figura 2



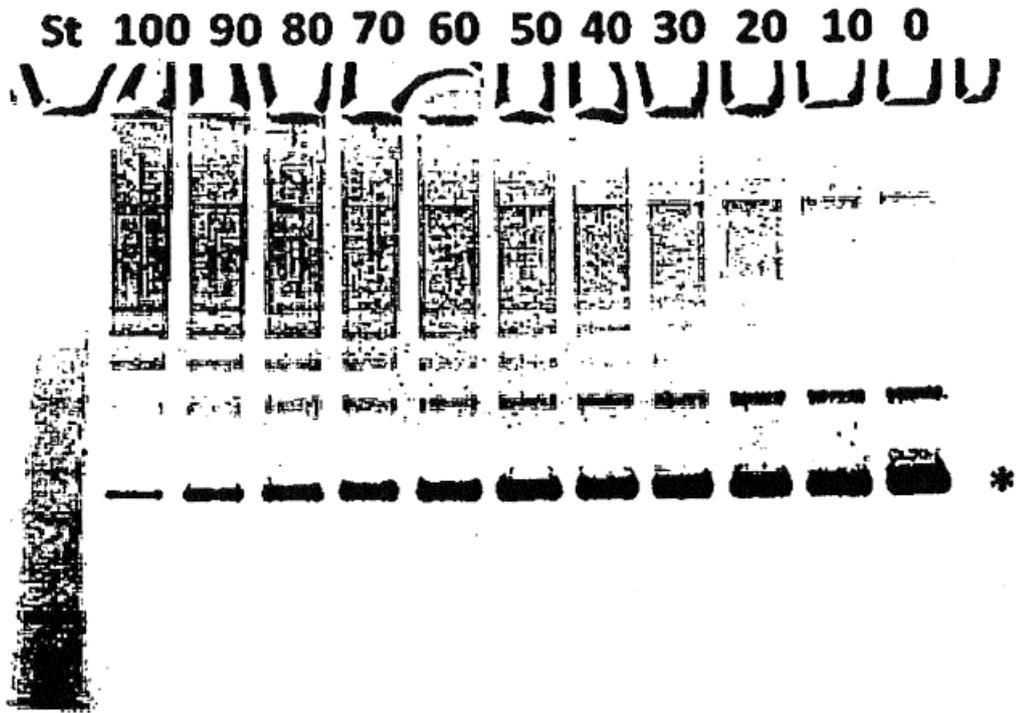


Figura 3

Figura 4

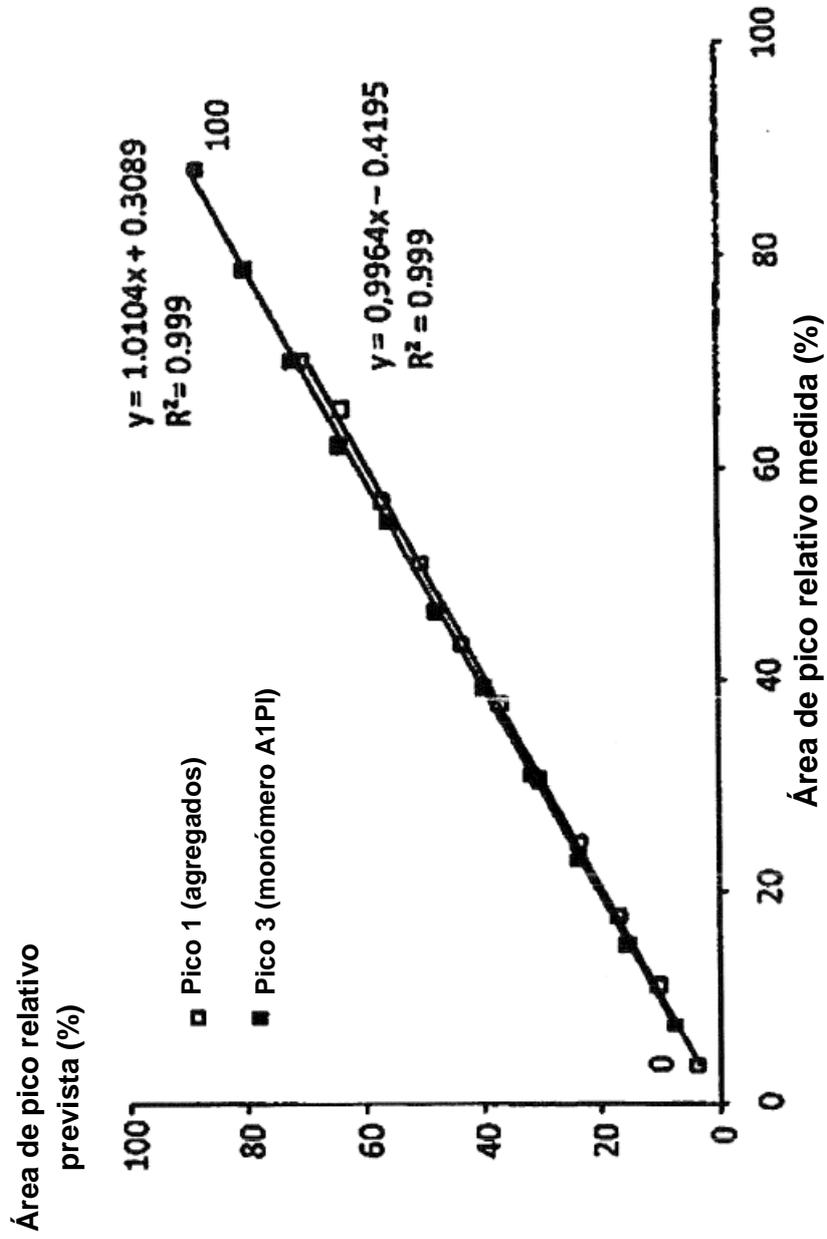


Figura 5

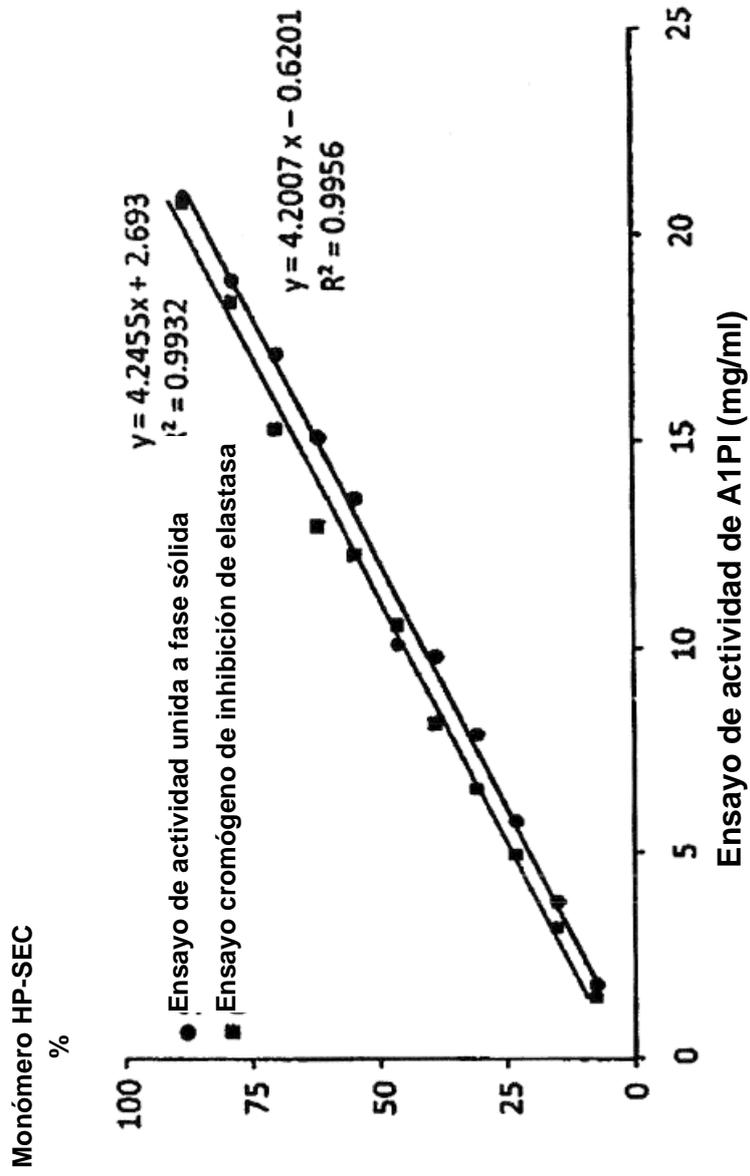


Figura 6

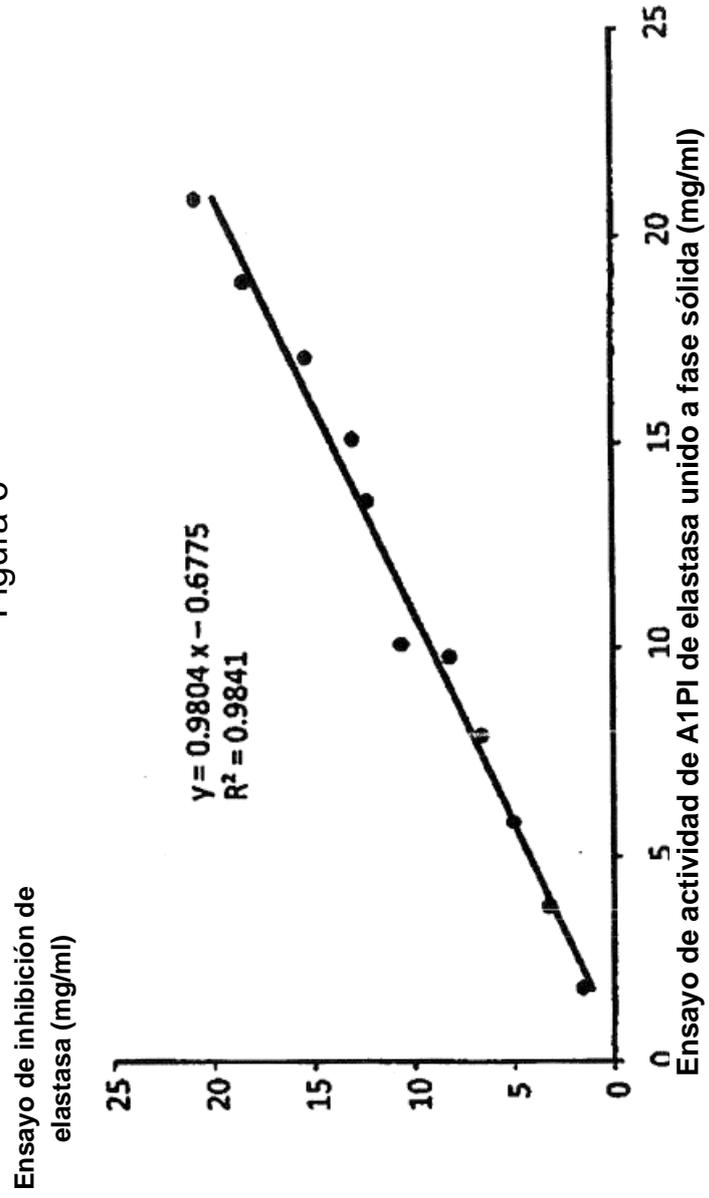


Figura 7

