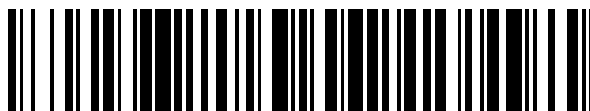


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 493**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2014 PCT/EP2014/055888**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14154651**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2014 E 14714218 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2979091**

54 Título: **Análisis biológico de péptidoglicanos**

30 Prioridad:

26.03.2013 FR 1352732
22.07.2013 FR 1357197

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.08.2018

73 Titular/es:

ROQUETTE FRÈRES (100.0%)
1 rue de la Haute Loge
62136 Lestrem, FR

72 Inventor/es:

LANOS, PIERRE;
BIGUET, MARC;
BERNARD, ROSELYNE;
ALLAIN, FABRICE;
CARPENTIER, MATHIEU;
DENYS, AGNÈS y
HACINE-GHERBI, HÉLA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 679 493 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

Análisis biológico de péptidoglicanos

La presente invención se refiere a un análisis de péptidoglicanos en una muestra, en particular una muestra de polímeros de glucosa.

5 Contexto de la invención

Los episodios inflamatorios asépticos son complicaciones importantes observadas durante los tratamientos que utilizan productos manufacturados con fines terapéuticos (por ejemplo: diálisis peritoneal, alimentación parenteral, inyección por vía venosa). Aunque una parte de estos episodios inflamatorios están relacionados con un problema de naturaleza química (presencia accidental de contaminantes químicos o dosificación incorrecta de ciertos compuestos),
10 la mayoría de los casos son el resultado de la presencia de contaminantes de origen microbiano liberados durante el proceso de fabricación. Se ha establecido ahora sin ninguna duda que los lipopolisacáridos (LPS) y los péptidoglicanos (PGN) son los principales contaminantes que presentan un riesgo elevado de provocar tales episodios inflamatorios cuando están presentes al nivel de trazas en los productos manufacturados.

El ensayo LAL (*Limulus anebocyte lysate*) se utiliza de manera habitual en muchos laboratorios de control de calidad para detectar y analizar las contaminaciones con LPS. Este ensayo se basa en el reconocimiento de las endotoxinas por un complejo sensor extraído de la hemolinfa de límulo.
15

Se proponen actualmente otros ensayos también basados en la reactividad de extractos de la hemolinfa de invertebrados para la detección de PGN en productos para uso terapéutico (SLP-Wako, Immunetics). Sin embargo, estos ensayos presentan la desventaja de no ser muy específicos, ya que también reaccionan con otras moléculas de origen microbiano, tales como los β -glucanos. Además, estos métodos requieren la compra de un equipo específico para este uso, lo que aumenta en gran medida los costos y, por lo tanto, limita el acceso a estos métodos de análisis.
20

Por otro lado, LPS y PGN tienen estructuras variables en función de su origen bacteriano, lo que provoca grandes diferencias en la reactividad inflamatoria. Es por eso que también es necesario expresar los resultados de los análisis en unidades equivalentes de moléculas estándar (por ejemplo, LPS de *E. coli* en el ensayo LAL).

Además, estas moléculas están presentes los más frecuentemente en forma de complejos macromoleculares, lo que afecta a su solubilidad y a su potencial inflamatorio. Por ejemplo, los PGN son muy variables en tamaño y están frecuentemente agregados con otras moléculas de las paredes bacterianas, tales como los ácidos lipoteicoicos y lipopéptidos.
25

Así, los métodos "biológicos" se han desarrollado únicamente para tener en cuenta la carga inflamatoria asociada con estas moléculas. Las células efectoras de la respuesta inflamatoria poseen sensores especializados en el reconocimiento de estructuras moleculares producidas específicamente por los agentes infecciosos. Estas moléculas, denominadas PAMP, por *patholgen-associated molecular pattern molecules*, se reconocen esencialmente por los TLR (acrónimo anglosajón de *Toll Like Receptors*) y los NLR (acrónimo anglosajón por *Nod-like receptors*), cuya especificidad está relacionada con la estructura molecular de las diferentes familias de moléculas inflamatorias. Por el contrario, al LPS (que es un ligando reconocido por los receptores de tipo LTR4), el PGN es un ligando reconocido por los receptores de tipo TLR2.
30
35

En estos últimos años, se han desarrollado ensayos celulares *in vitro* para reemplazar los modelos en animales de la respuesta inflamatoria. La mayoría de estos ensayos se basan en la incubación de células monocíticas en presencia de los productos contaminados y en una revaloración de la producción de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL- β , IL-6, IL-8, RANTES). Sin embargo, los ensayos que utilizan unas células primarias aisladas de la sangre están sujetos a una variabilidad interindividual de los donantes, lo que puede ser responsable del sesgo experimental.
40

Por el contrario, las líneas celulares monocíticas dan unas respuestas constantes, lo que explica por qué generalmente se prefieren a las células primarias. Sin embargo, estas líneas no aportan tampoco total satisfacción. Por ejemplo, la elección de las citoquinas se critica frecuentemente, ya que la mayoría se expresa de manera transitoria y su concentración en el medio de cultivo no refleja siempre la carga real en moléculas inflamatorias. Dado que todas las células monocíticas expresan la mayoría de TLR/NLR, los ensayos basados en su utilización no son selectivos de un tipo de contaminante, sino que darán una respuesta inflamatoria global.
45

Por otro lado, el problema principal proviene de las diferencias de sensibilidad de las células frente a diferentes moléculas inflamatorias. Así, los PGN, ligandos de TLR2, son claramente menos reactivos que los LPS, lo que les hace muy difícilmente detectables por estos enfoques. En efecto, los LPS inducen una respuesta significativa para concentraciones del orden del ng/ml, mientras que unas concentraciones 100 veces más elevadas en PGN son necesarias para obtener una respuesta similar (relación p/p).
50

Desde hace algunos años, e han propuesto líneas celulares transfectadas para sustituir los modelos anteriores en los ensayos biológicos de detección y de cuantificación de la reactividad de los compuestos inflamatorios. Estas líneas no inflamatorias (por ejemplo: HEK-293) se transfectan de manera estable por un gen que codifica un receptor específico
55

de una familia de agonistas inflamatorios. Contiene también un vector de expresión para un gen informador que codifica una enzima (por ejemplo, la luciferasa o la fosfatasa alcalina), cuya síntesis depende de la activación del receptor inflamatorio. Así, el reconocimiento de un contaminante por las células que expresan el buen receptor iniciará la síntesis de la enzima, cuya producción estará seguida por transformación de su sustrato en producto coloreado o luminiscente. Al ser este producto fácilmente cuantificable, este método permite un análisis rápido de la respuesta inflamatoria asociada a un tipo de contaminante.

Las ventajas de estos modelos celulares son numerosas: sustitución de los análisis ELISA de las citoquinas por un ensayo enzimático, gran reproducibilidad en los análisis debido al carácter estable de las líneas, selección de algunas familias de moléculas inflamatorias en función del receptor expresado, detección de los contaminantes a umbrales muy bajos.

Estos modelos celulares pueden, por lo tanto, sustituir a los ensayos de respuesta citoquímica *in vitro*, ya que permiten apuntar específicamente a los factores inflamatorios agonistas de un TLR o de un NLR dado, y cuantificar la respuesta inflamatoria asociada a este agonista. Por ejemplo, unas células que expresan específicamente TLR2 y TLR4 ya se han utilizado para la detección de contaminantes en productos alimenticios (estudios de Clett Erridge del Departamento de Ciencias Cardiovasculares de la Universidad de Leicester - UK en *British Journal of Nutrition*, Vol. 105 / número 01 / enero de 2011, páginas 15-23).

Además, compañías tales como InvivoGen comercializan ahora una amplia gama de células de la línea HEK-293 (HEK-Blue™) transfectadas con los diferentes receptores TLR o NRL. Estas células contienen como informador un gen que codifica una forma segregada de fosfatasa alcalina (SEAP: *secreted embryonic alkaline phosphatase*), lo que permite un análisis colorimétrico fácil y rápido de la respuesta a los agonistas inflamatorios.

Estas células HEK-Blue™ ya se han utilizado con éxito para detectar la presencia de contaminantes en soluciones concentradas de polímero de glucosa y sus efectos sinérgicos (WO2012/143647). Como el objetivo mostrado en esta solicitud es detectar única y solamente los contaminantes que se encuentran en una forma que presenta un poder inflamatorio, los métodos descritos en esta solicitud de patente no son adecuados para la medición de la cantidad total de PGN contenida en la muestra. En efecto, los PGN solubles (MM ≈ 120 kDa) son los que inducen una respuesta inflamatoria a través del receptor TLR2. Así, los PGN que no presentan un tamaño adecuado para ser inflamatorios o agregados con otras moléculas no se detectan por el método descrito en esta solicitud.

Así, existe una necesidad constante de desarrollar unos métodos alternativos de análisis de PGN total en una muestra, en particular una muestra de polímeros de glucosa.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere por lo tanto a un método biológico de análisis de los péptidoglicanos en una muestra, en particular una muestra de polímeros de glucosa.

En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de análisis de péptidoglicanos (PGN) en una muestra de polímero de glucosa que comprende:

a) tratar la muestra de polímero de glucosa por sonicación, calentamiento y/o alcalinización;

b) poner en contacto la muestra tratada o una dilución de esta con una célula recombinante que expresa un receptor TLR2 (Toll-like Receptor2) exógeno y un gen informador bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, codificando el gen informador para una proteína coloreada o fluorescente o para una proteína cuya actividad se puede medir con o sin sustrato;

c) medir la señal de gen informador; y

d) determinar la cantidad de PGN en la muestra con la ayuda de una curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal de gen informador, siendo dicha curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal de gen informador, o bien estandarizada o calibrada con el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄, o bien se ha preparado con trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄.

Preferentemente, el tratamiento de la muestra por sonicación, calentamiento y/o alcalinización permite fragmentar y disgregar los PGN contenidos en la muestra, en particular a fin de hacerlos capaces de activar el receptor TLR2. En particular, el tratamiento de la muestra permite generar unos PGN que presentan mayoritariamente un tamaño de aproximadamente 120 kDa.

Preferentemente, el gen informador es una fosfatasa alcalina segregada. En un modo de realización preferido, la célula es una célula de la línea HEK-Blue™ hTLR2.

Preferentemente, la curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal del gen informador se ha preparado con PGN que proviene de una bacteria seleccionada entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*, preferentemente de entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, y *Alicyclobacillus acidocaldarius*. En particular, el procedimiento puede comprender una

etapa previa de preparación de la curva de calibración utilizando PGN que provienen de una bacteria seleccionada entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*, preferentemente de entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, y *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

5 Preferentemente, la muestra se diluye, si es necesario, a fin de generar una señal del gen informador que corresponde a la parte lineal de la curva de calibración.

Preferentemente, la muestra es una muestra de una solución de icodextrina.

Preferentemente, la curva de calibración correspondiente entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal del gen informador se estandariza o calibra con trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄.

10 En un modo de realización alternativo, la curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal del gen informador se ha preparado con trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄. En particular, el procedimiento puede comprender una etapa previa de preparación de la curva de calibración utilizando el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄.

La invención se refiere además a un kit que permite el análisis de péptidoglicanos (PGN) en una muestra de polímeros de glucosa, que comprende:

15 - una célula recombinante que expresa un receptor TLR2 (Toll-like Receptor 2) exógeno y un gen informador bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, codificando el gen informador una proteína coloreada o fluorescente o una proteína cuya actividad se puede medir con o sin sustrato; y

20 - un estándar de PGN, que proviene preferentemente de una bacteria seleccionada entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*, preferentemente de entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*,

- opcionalmente un prospecto de uso y/o una solución de pretratamiento de la muestra;

comprendiendo además dicho kit el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄.

Finalmente, la invención se refiere a la utilización de un kit para el análisis de péptidoglicanos (PGN) en una muestra de polímeros de glucosa según el procedimiento de la invención, comprendiendo dicho kit:

25 - una célula recombinante que expresa un receptor TLR2 (Toll-like Receptor 2) exógeno y un gen informador bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, codificando el gen informador una proteína coloreada o fluorescente o una proteína cuya actividad se puede medir con o son sustrato; y

30 - o bien una curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal de gen informador, o bien un estándar de PGN, que proviene preferentemente de una bacteria seleccionada entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*, preferentemente de entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*,

- opcionalmente un prospecto de uso, /o una solución de pretratamiento de la muestra;

comprendiendo además dicho kit el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención se refiere por lo tanto a un método biológico de análisis de los péptidoglicanos en una muestra de polímeros de glucosa tal como se define en las reivindicaciones. En particular, la presente descripción describe un procedimiento de análisis de péptidoglicanos (PGN) en una muestra de polímero de glucosa, que comprende:

a) tratar la muestra de polímero de glucosa por sonicación, calentamiento y/o alcalinización;

40 b) poner en contacto la muestra tratada o una dilución de esta con una célula recombinante que expresa un receptor TLR2 (Toll-like Receptor2) exógeno y un gen informador bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, codificando el gen informador para una proteína coloreada o fluorescente o para una proteína cuya actividad se puede medir con o sin sustrato;

c) medir la señal de gen informador; y

45 d) determinar la cantidad de PGN en la muestra con la ayuda de una curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal de gen informador.

Preferentemente, los polímeros de glucosa están destinados a la diálisis peritoneal, la nutrición enteral y parenteral y la alimentación de los recién nacidos. En un aspecto preferido, los polímeros de glucosa que se ensayarán son icodextrina o maltodextrinas. En particular, pueden estar destinados a la preparación de diálisis peritoneal. Pueden ensayarse en una o varias fases de su preparación, y en particular a nivel de la materia prima, en una etapa cualquiera

de su procedimiento de preparación, y/o a nivel del producto final del procedimiento. Pueden también ensayarse como muestra de una solución de diálisis peritoneal.

5 En una primera etapa del procedimiento, la muestra de polímero de glucosa se trata por sonicación, calentamiento y/o alcalinización. El objetivo de este tratamiento es fragmentar los PGN y/o disgregar los PGN contenidos o atrapados en unos agregados, siendo el objetivo generar unos PGN capaces de interactuar con los receptores TLR2 y activarlos. Como se ha indicado anteriormente, este tratamiento debe permitir disgregar los PGN contenidos o atrapados en agregados y fragmentar los PGN de tamaño demasiado elevado, en particular para generar unos PGN solubles de tamaños comprendidos entre 30 y 5000 kDa, en particular de aproximadamente 120 kDa. Sin embargo, el tratamiento no debe afectar la capacidad de los PGN a interactuar con los receptores TLR2. Se optimiza preferentemente para liberar al máximo de PGN capaces de interactuar con TLR2 y activar el receptor y para conservar un máximo de PGN ya activos sobre TLR2.

10 En un primer modo de realización, el tratamiento de la muestra comprende al menos una etapa de sonicación. Facultativamente, la sonicación puede durar de 30 segundos a 5 minutos, utilizar una potencia de 20 a 40 kHz y/o comprender uno o varios ciclos de sonicación, por ejemplo de 1 a 5 ciclos. En un modo de realización preferido, la muestra se tratará mediante una sonicación durante 1 minuto a 35 kHz en un ciclo único. Facultativamente, el tratamiento por sonicación puede combinarse con un tratamiento mediante calor y/o por alcalinización.

15 En un segundo modo de realización, el tratamiento de la muestra comprende al menos una etapa de alcalinización. Preferentemente, el agente alcalinizante es NaOH, en particular a una concentración comprendida entre 0,1 y 1M. Facultativamente, la duración de la etapa de alcalinización puede durar de 5 minutos a 60 minutos. Facultativamente, la etapa de alcalinización se puede realizar a una temperatura elevada, en particular una temperatura comprendida entre 20°C y 80°C, por ejemplo a una temperatura de 20, 40, 60 u 80°C. Facultativamente, el tratamiento por alcalinización puede combinarse con un tratamiento por sonicación.

20 En un segundo modo de realización, el tratamiento de la muestra comprende al menos una etapa de calentamiento. Facultativamente, la duración de la etapa de calentamiento puede durar de 5 minutos a 60 minutos. Facultativamente, la etapa de calentamiento se puede realizar a una temperatura elevada, en particular una temperatura comprendida entre 20°C y 80°C, por ejemplo a una temperatura de 20, 40, 60 o 80°C. Facultativamente, el tratamiento de calentamiento puede combinarse con un tratamiento por sonicación y/o por alcalinización.

Los modos de tratamiento de la muestra no comprenden etapas de tratamiento enzimático, en particular por una mutanolisina.

25 En una etapa subsiguiente, la muestra y/o unas diluciones de esta, se pone en contacto con unas células recombinantes que expresan el receptor TLR2. Las células se califican como recombinantes ya que son unas células que se han modificado por la introducción de un ácido nucleico que codifica para el receptor TLR2, preferentemente el receptor TLR2 humano, no expresando la célula inicial TLR2.

30 La actividad del receptor TLR2 se detecta utilizando un gen informador que está bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada a dicho receptor. De manera preferida, este gen informador codifica para una proteína coloreada o fluorescente, o para una proteína cuya actividad se puede medir con o sin sustrato. De manera particular, el gen informador codifica para una fosfatasa alcalina. En particular, el gen informador puede producir una forma segregada de la fosfatasa alcalina (acrónimo anglosajón SEAP: *secreted embryonic alkaline phosphatase*), cuya síntesis está bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada a TLR2.

35 En un modo de realización preferido, la línea celular utilizada es una línea HEK-Blue™ (comercializada por la compañía InvivoGen), modificadas por transfección estable con unos vectores que codifican TLR2 humano: la línea HEK-Blue™ hTLR2. Sin embargo, cabe señalar que el experto en la materia puede también utilizar otras líneas comercialmente (Imgenex) o puede prepararlas.

40 Cuando la célula es HEK-Blue™ hTLR2, la célula se utiliza preferentemente a una densidad de aproximadamente 50000 células/pocillo para una placa de 96 pocillos.

En un modo de realización particular, la muestra de polímeros de glucosa o una dilución de este presenta una concentración de polímeros de glucosa de 5 a 50 mg/ml, preferentemente entre 5, 10, 20, 30 o 40 mg/ml. En el modo de realización preferido, la muestra de polímeros de glucosa o una dilución de esta presenta una concentración de polímeros de glucosa de aproximadamente 37,5 mg/ml.

45 En otro modo de realización particular, la muestra de polímeros de glucosa o una dilución de esta presenta una concentración máxima de polímero de glucosa del 3,75% (peso/volumen), preferentemente el 3%.

Por ejemplo, las muestras se preparan a fin de obtener una concentración de polímero de glucosa del 3,75% (peso/volumen), preferentemente del 3%, y las muestras se someten al procedimiento de análisis según la presente invención ensayando la muestra, así como unas diluciones 1/0, 1/100 y 1/1000.

Preferentemente, la puesta en contacto de la muestra de polímeros de glucosa o de una dilución de esta con las células tarda aproximadamente 5 a 48h, preferentemente de 10 a 36h, más preferentemente de 16 a 24h.

Después, el procedimiento comprende la medición de la señal del gen informador.

5 En un modo de realización preferido que utiliza la línea HEK-Blue™ hTLR2, la señal es la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina. Preferentemente, la reacción enzimática se realiza utilizando una relación 1:3 de medio a ensayar frente al reactivo SEAP (por ejemplo 50 µl de medio y 150 µl de reactivo SEAP). Además, se preferirá un tiempo de reacción de al menos 60 minutos.

Finalmente, la cantidad de PGN en la muestra se determina con la ayuda de una curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal del gen informador.

10 Esta curva se realiza preferentemente con las mismas células, en las mismas condiciones, con unas dosis crecientes de PGN, en particular unos estándares de PGN.

15 El estándar de PGN puede ser cualquier PGN de origen bacteriano. Por ejemplo, los PGN pueden proceder de los microorganismos siguientes: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*. En particular, los estándares utilizados son unos PGN purificados y parcialmente digeridos. Tales estándares están disponibles comercialmente (Invitrogen, Catalog # tlr1-pgnec or tlr1-pgnek from *E coli*; Catalog # tlr1-pgnb2 from *B subtilis*; Catalog # tlr1-pgnsa from *S aureus*) (Wako Pure Chemical, Catalog # 162-18101 from *M luteus*).

20 El estándar de PGN se calibra preferentemente utilizando un patrón interno agonista de TLR2, a fin de expresar los resultados en unidades equivalentes de PGN activo. El patrón interno puede ser un lipopéptido, preferentemente de síntesis, en particular el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄ (Pam3(cys), significando PAM o Pam el ácido palmítico) (véase la figura 5). Así, la curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal de gen informador se estandariza o calibra preferentemente con un patrón interno agonista de TLR2, preferentemente un lipopéptido, en particular el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄. Este patrón interno es preferentemente de síntesis o con una estructura/composición bien definida. La calibración o estandarización se realiza comparando las pendientes de las partes lineales de cada curva dosis-respuesta y calculando un factor de corrección que permite superponer la curva obtenida con el patrón de calibración y la del estándar PGN.

25 Por ejemplo, la curva de calibración se puede realizar utilizando unas concentraciones de PGN que van de 0,001 a 1000 ng/ml, en particular de 0,01 a 100 ng/ml.

30 Esta curva de calibración se puede realizar o bien con unos PGN únicamente, bien con una solución de polímero de glucosa en la que unas cantidades definidas de PGN se han añadido. En particular, la solución de polímero de glucosa utilizada puede comprender el 3,75% (peso/volumen) de polímero de glucosa, preferentemente el 3%.

35 Esta curva de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal de gen informador se puede realizar también con un patrón interno agonista de TLR2, preferentemente un lipopéptido, en particular trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄, en particular con las mismas células, en las mismas condiciones, con unas dosis crecientes de patrón interno agonista de TLR2. Este patrón interno es preferentemente de síntesis o tiene una estructura/composición bien definida. Así como para el PGN, ésta se puede realizar en ausencia o en presencia de polímero de glucosa, preferentemente en presencia.

Típicamente, la curva de calibración es una curva clásica de respuesta celular de tipo sigmoide (figura 1).

40 - la parte (A) corresponde a las respuestas obtenidas con unas concentraciones débiles en PGN, por debajo de las que dan una activación eficaz de TLR2. Esta zona no lineal corresponde por lo tanto al umbral límite de detección del método. A fin de incluir la variabilidad del método, se estima este umbral de detección a tres veces el valor del ruido de fondo (respuesta obtenida en ausencia de estímulos).

45 - la parte (B) es la más interesante, ya que se observa una respuesta lineal. Esta zona de respuesta eficaz permite determinar una relación directa entre la respuesta celular y el porcentaje de PGN. Se trata por lo tanto de la zona de análisis.

- la parte (C) corresponde a una saturación de la respuesta celular en presencia de concentraciones demasiadas fuertes en PGN. Existe en realidad una saturación de los receptores TLR2.

Se coloca en la parte lineal de la curva de calibración, correspondiendo esta parte a una zona (parte B) en la que la cantidad de PGN es directamente proporcional a la señal del gen informador.

50 En el caso de muestras susceptibles de ser fuertemente contaminadas en PGN, se necesitarán realizar varias diluciones en serie a fin de siempre situarse en la zona de linealidad. Por el contrario, unas concentraciones débiles en PGN necesitan una etapa de concentración de la muestra si se desea aumentar la sensibilidad del análisis.

Facultativamente, el procedimiento comprende además un ensayo con una célula control que no expresa TLR2, más generalmente que no expresa ningún receptor de la inmunidad innata. Por ejemplo, puede utilizarse la línea HEK-Blue™ Null2. Se trata de una línea control, cuya utilización es útil para verificar que la muestra de polímeros de glucosa no induce a la producción de la enzima por un mecanismo intrínseco.

5 La presente descripción describe un kit que permite el análisis de péptidoglicanos (PGN) en una muestra de polímeros de glucosa, comprendiendo el kit:

10 - una célula recombinante que expresa un receptor TLR2 (Toll-like Receptor2) exógeno y un gen informador bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, codificando el gen informador para una proteína coloreada o fluorescente o para una proteína cuya actividad se puede medir con o sin sustrato. En particular la célula es preferentemente la línea HEK-Blue™ hTLR2. A título de control negativo, el kit puede también comprender una célula que no expresa el receptor de la inmunidad innata, por ejemplo la línea HEK-Blue™ Null2.

15 - o bien una curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal de gen informador, o bien un estándar calibrado de PGN, que proviene preferentemente de una bacteria seleccionada entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, y *Alicyclobacillus acidocaldarius*, preferentemente *Staphylococcus aureus*, o bien un patrón interno agonista de TLR2, preferentemente un lipopéptido, en particular trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄. Opcionalmente, el kit puede comprender los dos, es decir una curva de calibración así como un estándar calibrado de PGN que proviene del mismo microorganismo que aquel utilizado para preparar esta curva de calibración.

20 - facultativamente, un prospecto de utilización, una solución de pretratamiento de la muestra, los reactivos útiles para medir la respuesta del gen informador, unas microplacas, etc.

Preferentemente, el kit comprende además un patrón interno agonista de TLR2, preferentemente un lipopéptido, en particular el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄.

Descripción de las figuras

Figura 1: curva teórica de la respuesta celular en función de concentraciones crecientes de PGN.

25 Figura 2: curva de calibración de la respuesta celular en función del porcentaje de PGN de *S. aureus* obtenida con las células HEK-Blue™ hTLR2.

Figura 3: respuesta de las células HEK-Blue™ hTLR2 en función de las concentraciones crecientes en PGN de diferentes especies bacterianas.

30 Figura 4: respuesta de las células HEK-Blue™ hTLR2 en función de las concentraciones crecientes en PGN de *S. aureus* procedente de lotes diferentes.

Figura 5: estructura de trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄ (PAM3(cys))

Figura 6: comparación de las respuestas inducidas por los PGN de *S. aureus* y el (PAM3(cys) en las células HEK-Blue™ hTLR2.

Figura 7: respuesta de las células HEK-Blue™ hTLR2 en función de las concentraciones corregidas en PGN.

35 Figura 8: curva de calibración de la respuesta de las células HEK-Blue™ hTLR2 en función de las concentraciones corregidas en PGN activo.

Ejemplos

El análisis se basa en el reconocimiento específico de los PGN por una línea que expresa el receptor TLR2 y sobre la producción de una actividad enzimática medible a través de la activación de la vía de señalización asociada a TLR2.

40 Material celular

Para los experimentos relativos a este análisis, se utilizan dos líneas:

- línea HEK-Blue™ hTLR2 (HEK-TLR2): respuesta específica para los ligandos de TLR2, con una fuerte reactividad para los PGN solubles.

- línea HEK-Blue™ Null2 (HEK-Null): respuesta no específica relacionada con un efecto citotóxico de la muestra.

45 Las células se cultivan según las recomendaciones del proveedor (InvivoGen). Al 75% de confluencia, las células se resuspenden a una densidad de 0,28x10⁶ células/ml. Antes de la estimulación, se reparten 180 µl de la suspensión celular en los pocillos de cultivo (caja de 96 pocillos), es decir 50000 células/pocillos. Las células se estimulan después durante 24h por adición de 20 µl de muestras de polímero de glucosa al 37,5% (peso/volumen) (es decir una dilución

final de las muestras al 3,75%). Después de 24h de estimulación, la respuesta celular se mide por cuantificación de la actividad enzimática producida.

1- Establecimiento de la curva evaluación-respuestas

5 Una curva dosis-respuestas se ha realizado diluyendo diferentes cantidades de PGN estándar de *S. aureus* (figura 2) en una solución de icodextrina no contaminada preparada al 37,5% (peso/volumen)(figura 2).

El resultado es una curva clásica de respuesta celular de tipo sigmoide.

- la parte (A) corresponde a las respuestas obtenidas con unas concentraciones débiles en PGN, por debajo de aquellas que dan una activación eficaz de TLR2. Esta zona no lineal corresponde por lo tanto al umbral límite de detección del método.

10 - la parte (B) es la más interesante, ya que se observa una respuesta lineal. Esta zona de respuesta eficaz permite determinar una relación directa entre la respuesta celular y el porcentaje de PGN. Se trata por lo tanto de la zona de análisis.

- la parte (C) corresponde a una saturación de la respuesta celular en presencia de concentraciones demasiado fuertes en PGN. Existe en realidad una saturación de los receptores TLR2.

15 La curva estándar de respuesta de las células HEK-TLR2 con PGN de *S. aureus* presenta una zona de linealidad para unas concentraciones comprendidas entre 0,07 y 10 ng/ml (es decir entre 2 y 267 ng/g de icodextrina).

2. Establecimiento de la curva de calibración para el análisis biológico de los PGN con un patrón interno

20 Las curvas dosis-respuesta se han realizado diluyendo los PGN de diferentes especies bacterianas en una solución de maltodextrina no contaminada (referenciada P-11.11) preparada al 37,5% (peso/volumen). Los PGN ensayados se extraen de *Staphylococcus aureus* (Sigma, Cat No 77140), *Micrococcus luteus* (Sigma, Cat No 53243), *Bacillus subtilis* (InvivoGen, # tlr1-pgnb2), y *Alicyclobacillus acidocaldarius* (preparación personal).

25 Las curvas obtenidas son clásicas de las respuestas observadas en los análisis realizados con un material celular (*bio-assay*) (figura 3). Lo valores de absorbancia inferiores a 0,2 demuestran concentraciones demasiado bajas en PGN para inducir a una respuesta celular, mientras que unos valores superiores a 2 muestran un efecto de meseta relacionado con la saturación de los receptores TLR2. Por lo tanto, sólo la zona comprendida entre estos dos valores de absorbancias límites permite correlacionar la producción de SEAP a la cantidad de PGN presente en las muestras.

30 Las respuestas observadas muestran una amplia variabilidad en la reactividad celular asociada en cada tipo de PGN. En efecto, las concentraciones que dan una respuesta igual al 50% de la respuesta máxima (EC50) son de ~ 20 ng/ml para los PGN de *S. aureus* y *B. subtilis*, 1500 ng/ml para *M. luteus*, y más de 2000 ng/ml para los extraídos de *A. acidocaldarius* y *E.coli* K12.

Estas diferencias eran no obstante esperadas, ya que los PGN tienen unas estructuras diferentes en función de su origen bacteriano, lo que es responsable de importantes variaciones de reactividad inflamatoria. Estas observaciones subrayan la importancia de definir un estándar interno a fin de poder expresar los resultados en unidades equivalentes de PGN.

35 Otro factor susceptible de modificar la respuesta de las células HEK-TLR2 es el tamaño de los PGN, que influirá su solubilidad y la reactividad frente a TLR2. Así, el procedimiento de purificación de estas macromoléculas puede ampliamente influenciar la respuesta de las células, ya que las condiciones de extracción podrán modificar el tamaño de los PGN, incluso provocar una degradación parcial. Para probar esta hipótesis, los ensayos se reprodujeron con 3 lotes distintos de PGN extraídos de *S. aureus*: 2 lotes Sigma (Cat N° 77140: lote 1, 0001442777; lote 2, BCBH7886V) y 1 lote InvivoGen (# tlr1-pgnsa).

40 Los resultados muestran una variabilidad de reactividad entre los tres lotes (figura 4). En efecto, los EC50 son respectivamente de 4, 20 y 400 ng/ml para los tres lotes. Estos datos indican que unos PGN extraídos de la misma especie bacteriana tienen el riesgo de presentar diferencias de reactividad, incluso si los lotes provienen del mismo proveedor y se han extraído a priori por el mismo procedimiento. Parece por lo tanto necesario introducir un patrón interno para la curva de calibración, a fin de evitar errores relativos a la variabilidad de los PGN y a expresar los resultados en cantidad de PGN "activo".

50 El trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄ (PAM3(cys) (figura 5) es un lipopéptido de síntesis triacilado que mimetiza la estructura de los lipopéptidos bacterianos y actúa como un agonista fuerte de TLR2. Siendo de estructura homogénea, se utiliza frecuentemente como control positivo para calibrar las respuestas de las células que expresan el receptor TLR2.

Los experimentos se han reproducido por lo tanto sustituyendo el PGN por el PAM3(cys) en nuestros ensayos. Como se esperaba, las células HEK-TLR2 muestran una fuerte reactividad frente a este compuesto. Además, el aspecto de la curva dosis-respuesta es similar a las obtenidas en presencia de PGN, con una EC50 estimada a 10 ng/ml (figura

6). Estos resultados indican que el PAM3(cys) induce a unas respuestas equivalentes a las de los PGN más reactivos, pero al contrario de estos últimos, no presenta variabilidad estructural. En consecuencia, este lipopéptido de síntesis se puede utilizar para calibrar los lotes de PGN y establecer una curva de calibración estandarizada, lo que permitirá formular los resultados en cantidades de PGN "activo", es decir en cantidades de PGN que dan unas respuestas TLR2 idénticas a las obtenidas con las mismas cantidades de PAM3(cys).

5 La calibración de cada lote de PGN con respecto al PAM3(cys) se realiza comparando las pendientes de las partes lineales de cada curva dosis-respuesta, y calculando un factor de corrección para superponer las curvas de los PGN a la del PAM3(cys). En el ejemplo presentado en la figura 6, los factores de correcciones se estimaron a 0,4, 2 y 40 respectivamente para los lotes 1, 2 y 3. Esto significa que se necesita 2,5 veces menos de PGN del lote 1 para obtener unas respuestas idénticas a las inducidas por el PAM3(cys), pero 2 veces más de PGN del lote 2, y 40 veces más de PGN del lote 3. Después de haber corregido las cantidades brutas de PGN, se puede observar que todos los puntos se alinean en una misma curva que se superpone a la obtenida con el PAM3(cys) (figura 7). En consecuencia, la utilización del patrón interno permite obtener unas concentraciones corregidas para todos los lotes de PGN y establecer una curva dosis-respuesta calibrada en PGN activo.

10
15 Aplicando este método, la curva estándar de respuesta de las células HEK-TLR2 presenta una zona de linealidad para unas concentraciones de PGN activo comprendidas entre 0,5 y 200 ng/ml (figura 8), es decir entre 13 y 5400 ng/g de polímeros de glucosa.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de análisis de péptidoglicanos (PGN) en una muestra de polímero de glucosa, que comprende:
 - a) tratar la muestra de polímero de glucosa por sonicación, calentamiento y/o alcalinización;
 - 5 b) poner en contacto la muestra tratada o una dilución de esta con una célula recombinante que expresa un receptor TLR2 (Toll-like Receptor2) exógeno y un gen informador bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, codificando el gen informador para una proteína coloreada o fluorescente o para una proteína cuya actividad se puede medir con o sin sustrato;
 - c) medir la señal de gen informador; y
 - 10 d) determinar la cantidad de PGN en la muestra con la ayuda de una curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal de gen informador, caracterizado por que dicha curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal de gen informador, o bien estandarizada o calibrada con el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄, o bien se ha preparado con trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el tratamiento de la muestra por sonicación, calentamiento y/o alcalinización permite fragmentar y disgregar los PGN contenidos en la muestra, en particular a fin de hacerlos capaces de activar el receptor TLR2.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el tratamiento de la muestra permite generar unos PGN que presentan mayoritariamente un tamaño de aproximadamente 120 kDa.
- 20 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el gen informador es una fosfatasa alcalina segregada.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la célula es una célula de la línea HEK-Blue™ hTLR2.
- 25 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal del gen informador está estandarizada o calibrada con trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄, y en el que la curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal del gen informador se ha preparado con unos PGN que provienen de una bacteria seleccionada entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* et *Alicyclobacillus acidocaldarius*, preferentemente entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, y *Alicyclobacillus acidocaldarius*.
- 30 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el procedimiento comprende una etapa previa de preparación de la curva de calibración utilizando unos PGN que provienen de una bacteria seleccionada entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*.
- 35 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en el que la curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de la señal del gen informador se ha preparado con el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄, y en el que el procedimiento comprende una etapa previa de preparación de la curva de calibración utilizando el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la muestra se diluye, si fuese necesario, a fin de generar una señal del gen informador que corresponde a la parte lineal de la curva de calibración.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la muestra es una muestra de una solución de icodextrina.
- 40 11. Kit que permite la evaluación de péptidoglicanos (PGN) en una muestra de polímeros de glucosa que comprende:
 - una célula recombinante que expresa un receptor TLR2 (Toll-like Receptor 2) exógeno y un gen informador bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, codificando el gen informador para una proteína coloreada o fluorescente o para una proteína cuya actividad se puede medir con o sin sustrato; y
 - 45 - un estándar de PGN, que proviene preferentemente de una bacteria seleccionada entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*, preferiblemente entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, y *Alicyclobacillus acidocaldarius*;
 - opcionalmente un prospecto de uso, una solución de pretratamiento de la muestra;
 comprendiendo además dicho kit el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄.

12. Utilización de un kit para la evaluación de péptidoglicanos (PGN) en una muestra de polímeros de glucosa según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo dicho kit:

5 - una célula recombinante que expresa un receptor TLR2 (Toll-like Receptor 2) exógeno y un gen informador bajo la dependencia directa de la vía de señalización asociada al receptor TLR2, codificando el gen informador para una proteína coloreada o fluorescente o para una proteína cuya actividad se puede medir con o sin sustrato; y

10 - o bien una curva de calibración de correspondencia entre la cantidad de PGN y la intensidad de señal del gen informador, o bien un estándar de PGN, que proviene preferentemente de una bacteria seleccionada entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*, preferentemente entre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Alicyclobacillus acidocaldarius*,

- opcionalmente un prospecto de uso y/o solución de pretratamiento de la muestra;

comprendiendo además dicho kit el trihidrocloruro de PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄.

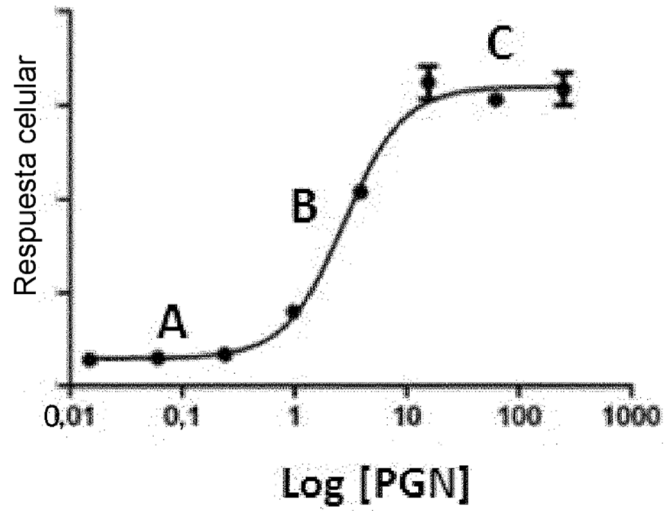


Figura 1

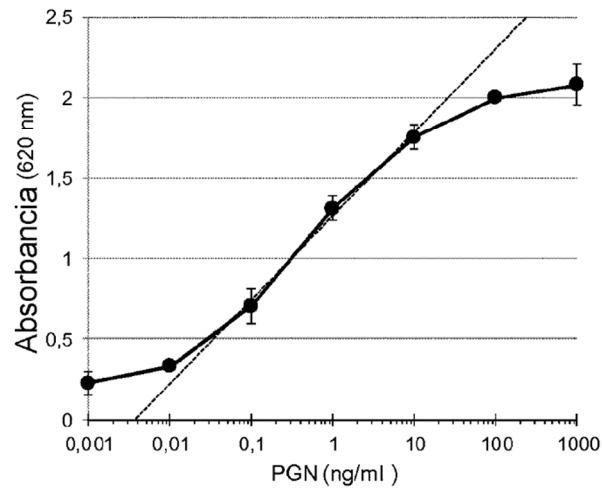


Figura 2

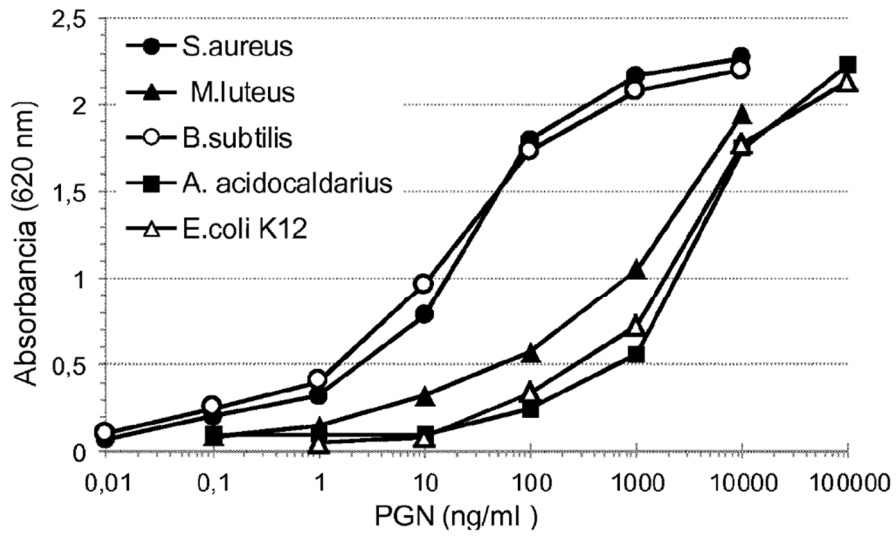


Figura 3

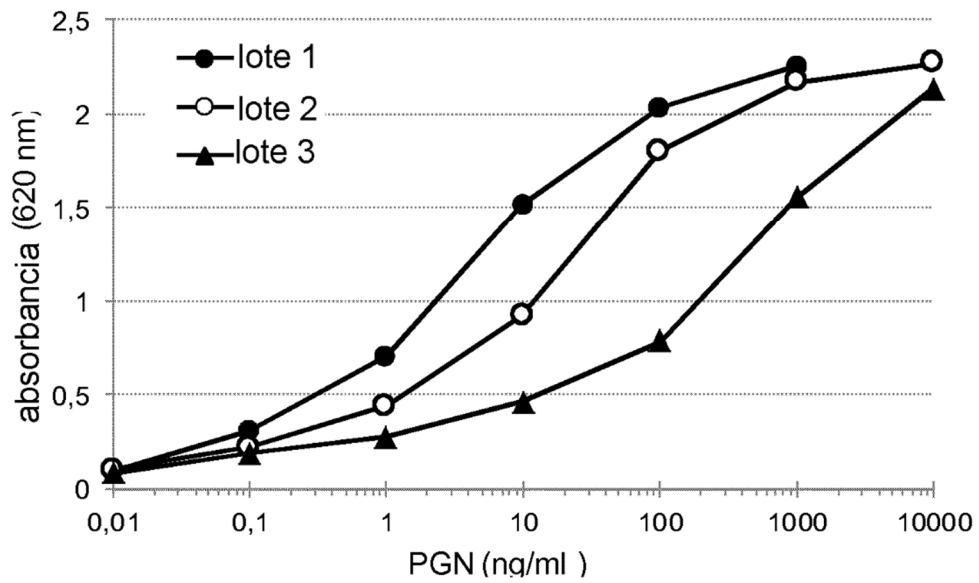


Figura 4

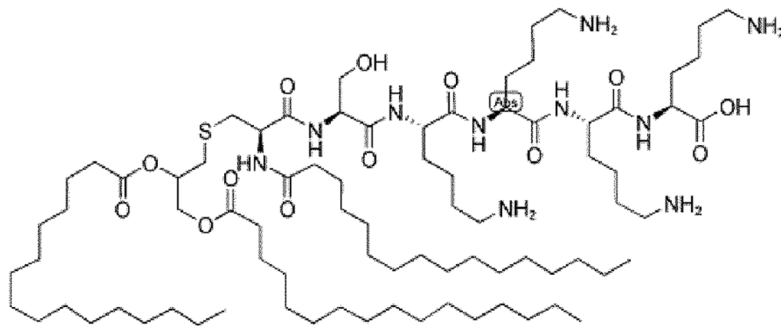


Figura 5

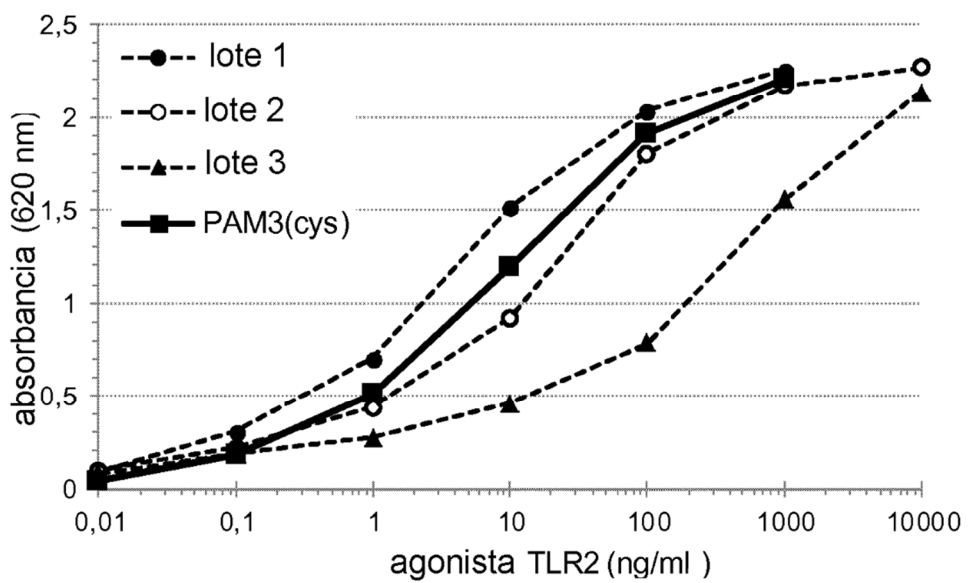


Figura 6

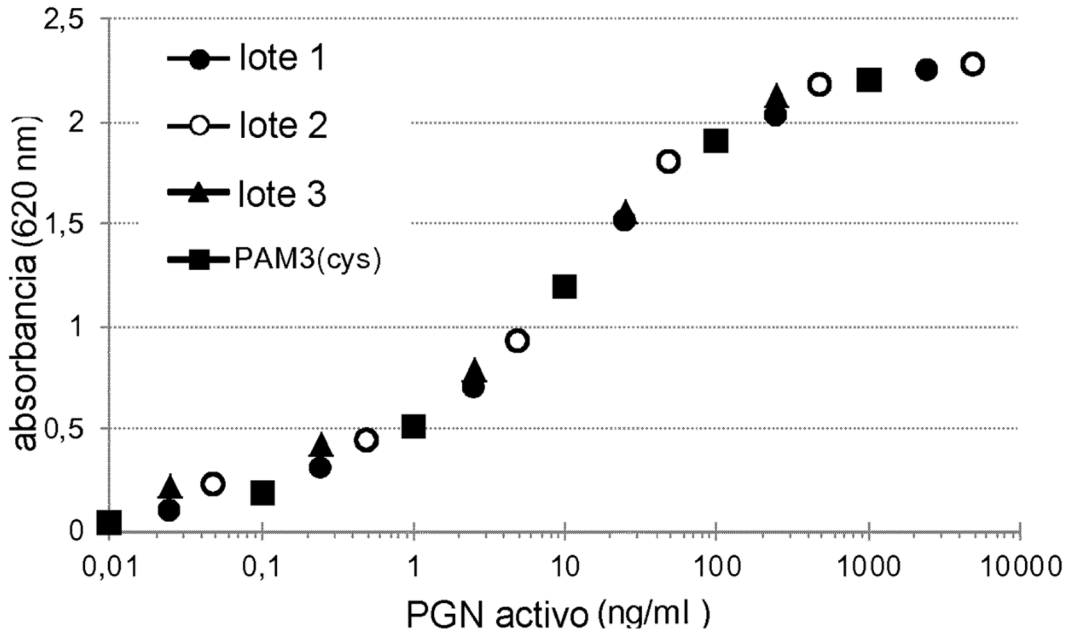


Figura 7

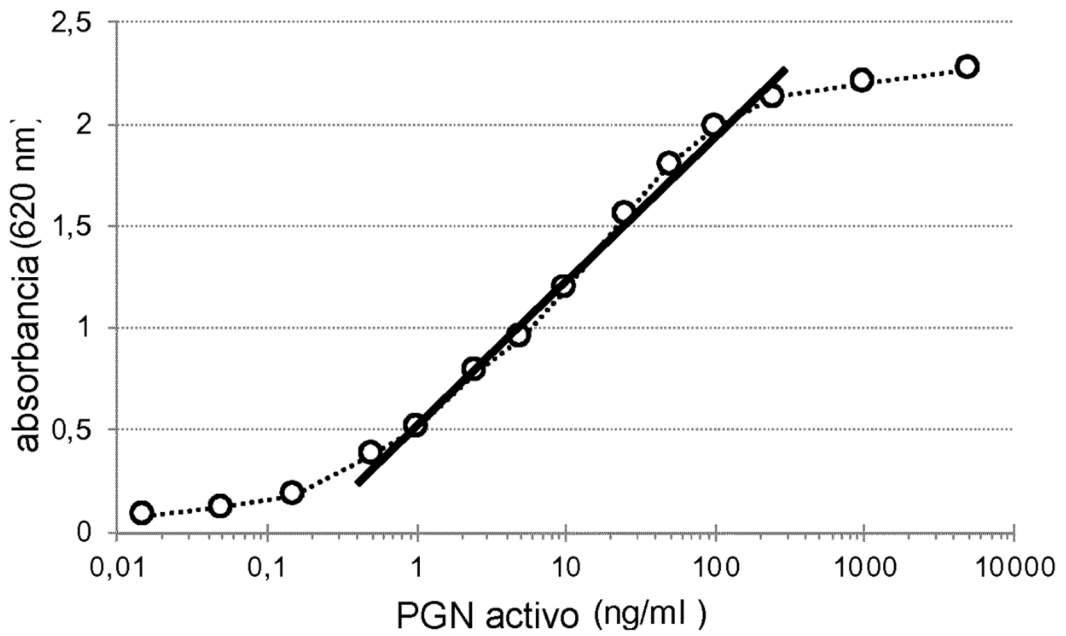


Figura 8