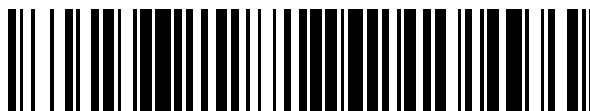


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 533**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/558** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

**C12Q 1/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2012 PCT/GB2012/051458**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13005003**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2012 E 12731634 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2729809**

54 Título: **Ensayo**

30 Prioridad:

**07.07.2011 GB 201111634**

**07.10.2011 GB 201117309**

**10.10.2011 US 201161545237 P**

**12.10.2011 EP 11184930**

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

**25.03.2019**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS  
(100.0%)**

**Langebrogade 1  
1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**ISAKSEN, MAI FAURSCHOU;  
KELLETT-SMITH, ANJA HEMMINGSEN;  
MCLENNAN, NEIL;  
GILBERT, CEINWEN y  
KYNEB, MAJBRIIT HAUGE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 705 533 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

### Campo

La presente invención pertenece al campo de los ensayos enzimáticos.

- 5 En particular, la presente invención versa sobre ensayos de tiras de actividad enzimática.

Más específicamente, la presente invención versa sobre dispositivos y métodos de ensayo que los usan y sobre usos de los mismos. Los dispositivos de ensayo y los ensayos pueden detectar una enzima activa. La enzima activa puede ser una fosfatasa, tal como una fitasa o una fosfatasa ácida, o un glucósido hidrolasa tal como una xilanasas, una 3-glucanasa o una amilasa. En un aspecto más preferido, la enzima activa es una fitasa.

- 10 La presente invención es útil para ser aplicada en diversas aplicaciones industriales, tales como la detección de una enzima activa en la producción de biocombustibles, en composiciones detergentes y en la detección de una enzima activa en alimentos y piensos para animales.

### Antecedentes

- 15 Determinar la presencia o ausencia de un analito, particularmente de una enzima, es frecuentemente necesario en el laboratorio, y también en campos tan diversos como el de los alimentos y los piensos para animales, producción de biocombustibles y jabones y polvos de lavado. Comúnmente, para este fin se usan ensayos, tales como los inmunoensayos.

- 20 Pueden usarse ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) para detectar la presencia de un anticuerpo o antígeno en una muestra. En tales métodos, un anticuerpo se une a un antígeno que está fijado a una superficie, o viceversa. Este anticuerpo está ligado a una enzima que puede crear una señal detectable, que suele ser un cambio de color.

- 25 Otro tipo común de ensayo o inmunoensayo es el ensayo de flujo lateral. En tales ensayos, se detecta la presencia de un analito en una muestra que fluye a lo largo de un soporte sólido. El analito, o un reactivo tal como un anticuerpo que esté unido al analito, se une entonces a líneas o zonas en el soporte que han sido tratadas con un antígeno o anticuerpos.

- 30 Tanto ELISA como los ensayos de flujo lateral también pueden ser ensayos de fase doble. Esto quiere decir que la muestra hace contacto en primer lugar con un anticuerpo de captura que se une al antígeno que ha de ser detectado. El antígeno se une entonces a un anticuerpo adicional, que es probable que esté en una línea de prueba fija en el caso de los ensayos de flujo lateral. El antígeno queda así encajonado entre al menos dos anticuerpos. El segundo anticuerpo está ligado a una señal detectable.

Muchos ensayos o inmunoensayos de los tipos descritos en lo que antecede determinan la presencia de una enzima específica.

Sin embargo, en algunas muestras la enzima existe, pero ha sido inactivada; por ejemplo, por calor o inactivación química. En tales casos, los ensayos existentes siguen detectando la presencia de la enzima.

- 35 Por ejemplo, el documento US4425438 describe un ensayo que usa una columna en lugar de un sistema de flujo lateral. La muestra fluye a través de zonas de perlas que están recubiertas con un absorbente de analitos. Las zonas en las que se produce la unión dan una medida de la cantidad del analito. En el documento US5073484 se describe otro ensayo en columna en el que tiene lugar la determinación cuantitativa de un analito en líquido usando zonas separadas a lo largo del recorrido de flujo.

- 40 Los dispositivos de flujo lateral, tales como, por ejemplo, el descrito en el documento US5451504, comúnmente tienen diferentes zonas para el depósito de la muestra, la captura o la inmovilización del analito y la detección del analito o complejo de analito atrapado. Tales dispositivos no cuantifican el analito ni identifican la actividad si el analito es una enzima.

- 45 El ensayo de flujo lateral dado a conocer en el documento US6183972 usa múltiples ubicaciones o bandas de captura para capturar un anticuerpo marcado anti analito y proporcionar una señal detectable. Las bandas proporcionan un patrón único de señales que, cuando son combinadas matemáticamente para crear una curva monótona de dosis-respuesta, indica la concentración del analito en la muestra.

El documento US5229073 describe un ensayo de flujo lateral que usa múltiples ubicaciones de captura para semicuantificar la cantidad de analito en una muestra.

Las moléculas grandes (por ejemplo, >3000 daltones) pueden ser detectadas usando el dispositivo de flujo lateral del documento US6358548. Dependiendo de la realización, la intensidad del color del número de líneas en los sitios de captura da una indicación de la cantidad del analito.

5 El documento US7425302 da a conocer un método de flujo lateral en el que los reactivos están secados. La adición de la muestra líquida reconstituye los reactivos secos. Este método cuantifica el analito en función de la intensidad de un cambio de color. La actividad de la enzima específica G6PD es determinada por la cantidad de tiempo que lleva que se produzca un cambio de color, que es una medida de cuán rápidamente reacciona la G6PD a su sustrato. Sin embargo, el método del documento US7425302 está limitado específicamente a la G6PD y no se retiene enzima alguna en una ubicación diferenciada de captura.

10 El documento WO2005/014847 describe el uso de un inmunoensayo de fase doble de flujo lateral estándar para detectar enzimas tales como fitasas, xilanasas y amilasas. La cantidad de las enzimas puede ser determinada, al menos parcialmente, por la intensidad del cambio de color resultante. El documento WO2007/001895 describe un ensayo de fase doble de oro coloidal que es usado específicamente para detectar la fitasa de *E. coli*. Este ensayo de fase doble de oro coloidal comprende un anticuerpo monoclonal primario que reconoce inmunológicamente la fitasa y un anticuerpo secundario que está conjugado con un medio de detección.

15 El documento WO 87/06706 describe ensayos electroquimioluminiscentes.

El documento WO 03/023051 describe un formato de ensayo de flujo lateral para ensayos enzimáticos.

El documento WO 2005/012567 describe métodos y equipos de reactivos para detectar una enzima capaz de modificar un ácido nucleico.

20 Bieniarz et al. *Analytical Biochemistry* 207, 2, 1992 describen un ensayo redox cromogénico para beta-lactamasas que genera productos hidrosolubles como un ensayo heterogéneo de fase doble.

El documento WO 2007/139243 describe métodos y equipos de reactivos para la medición *in situ* de la actividad y de la cantidad enzimática usando un sistema de medición única.

El documento WO 97/43438 describe un ensayo de actividad de fase sólida para una sustancia biológicamente activa.

25 El documento WO 97/24141 describe anticuerpos monoclonales y un método de inmunocaptura para la cuantificación y la especiación de parásitos de la malaria.

El documento US 2003/0124622 describe un procedimiento para la determinación de la actividad de la proteasa que activa el Factor VII a partir de soluciones de proteínas.

30 El documento WO2009/114712 describe ensayos para el diagnóstico y la evaluación de opciones de tratamiento para la enfermedad de Pompe.

En consecuencia, algunos de los ensayos previamente usados pueden proporcionar únicamente una determinación cuantitativa de una enzima en una muestra, pero no son capaces de determinar la actividad de la enzima o no identifican específicamente una enzima activa. Otros ensayos requieren un complicado análisis matemático de las bandas de captura para determinar la concentración de un analito.

35 Por lo tanto, existe la necesidad de un ensayo que detecte únicamente las formas activas de una enzima. También sería ventajoso que tal ensayo pudiera proporcionar al menos alguna información semicuantitativa.

La presente invención busca superar algunos de los problemas de los dispositivos y los métodos de la técnica anterior.

40 La presente invención será descrita a continuación. Para facilitar la referencia, se han descrito los elementos de la presente invención bajo uno o más encabezados. Ha de hacerse notar que las enseñanzas bajo cada uno de los encabezados también se aplican a las enseñanzas bajo los otros encabezados. Por ejemplo, cada uno de los referidos elementos y aspectos preferidos relativos al dispositivo de la presente invención es igualmente un elemento o aspecto preferido relativo al método de la presente invención o al uso de la presente invención. Asimismo, cada uno de los referidos elementos y aspectos preferidos relativos al método o al uso de la presente invención es igualmente un elemento o aspecto preferido relativo al dispositivo de la presente invención.

#### 45 **Aspectos de compendio**

En un aspecto amplio, la presente invención versa sobre un dispositivo que detecta una enzima activa en una muestra y sobre métodos para determinar la presencia de una enzima activa en una muestra.

En particular, la presente invención versa sobre dispositivos y equipos de reactivos para llevar a cabo tales ensayos, específicamente ensayos de flujo lateral y dispositivos para llevar a ensayos e inmunoensayos de flujo lateral.

#### 50 **Realizaciones generales**

En una realización, la presente invención proporciona un dispositivo de ensayo para detectar una enzima activa en una muestra.

5 El dispositivo comprende: (a) una región de colocación en la que puede colocarse la muestra; (b) una matriz operativamente conectada a dicha región de colocación, de modo que la muestra, cuando esté presente (tal como colocada) en dicha región de colocación pueda migrar a lo largo de dicha matriz; (c) al menos una ubicación diferenciada de captura en dicha matriz, estando cada ubicación diferenciada de captura alejada de la región de colocación, y pudiendo migrar la muestra a través de dicha ubicación diferenciada de captura; (d) medios de captura que están presentes en cada ubicación diferenciada de captura o que la definen, siendo dichos medios de captura capaces de unirse con dicha enzima, de modo que al menos una porción de dicha muestra de dicha enzima quede retenida en al menos una ubicación diferenciada de captura; (e) un medio de indicación selectiva o al menos un componente del mismo para proporcionar una indicación selectiva de la presencia de la enzima activa unida a dichos medios de captura, comprendiendo el medio de indicación selectiva un reactivo o especie reactiva; y (f) un sustrato de dicha enzima, estando unido dicho sustrato al dispositivo de ensayo; en el que dicha enzima actúa sobre dicho sustrato para generar un resto reactivo; en el que, además, dicho resto reactivo actúa sobre dicho reactivo o especie reactiva para generar un efecto funcional.

10 En otra realización, la presente invención proporciona un método de determinación de la presencia de una enzima activa en una muestra en el que la muestra es colocada en la región de colocación del dispositivo de ensayo de la invención y el medio de indicación selectiva de dicho dispositivo indica si está presente la enzima activa.

20 La presente invención facilita un método de determinación de niveles de la enzima activa en una muestra en el que la muestra es colocada en la región de colocación del dispositivo de ensayo de la invención y el medio de indicación selectiva del dispositivo indica semicuantitativamente la cantidad de enzima activa presente.

En otra realización, la presente invención proporciona un equipo de reactivos que comprende el dispositivo de ensayo de la presente invención.

25 En otra realización, la presente invención proporciona un método de determinación de la presencia de una enzima activa en una muestra, comprendiendo el método las etapas de:

- a) poner en contacto al menos una porción de la muestra con un medio de captura, con lo que la enzima es capturada por dicho medio de captura;
- b) proporcionar un sustrato adecuado para la enzima capturada, reaccionando dicho sustrato con dicha enzima capturada para producir un producto enzimático;
- 30 c) proporcionar una especie reactiva capaz de reaccionar con el producto enzimático, reaccionando dicha especie reactiva con dicho producto enzimático, produciendo un producto insoluble; y
- d) detectar el producto insoluble obtenido en la etapa c), correlacionándose dicha detección con la presencia y/o la cantidad de una enzima activa en dicha muestra.

#### **Algunas ventajas**

35 Una ventaja de la presente invención es que el dispositivo y los métodos que lo usan permiten a un operario identificar una enzima activa en una muestra.

Una ventaja adicional de la presente invención es que el dispositivo y los métodos que lo usan permiten a un operario identificar de forma simple una enzima activa en una muestra y, en algunos casos, al menos de manera semicuantitativa.

40 El término "semicuantitativo" usado en la presente memoria significa una cantidad relativa, una cantidad aproximada o una cantidad dentro de un intervalo conocido.

Preferentemente, el término "semicuantitativo" significa una estimación del nivel de la enzima activa; es decir, un nivel "bajo", "aceptable" o "alto" de la enzima activa. Sin embargo, no excluye una determinación cuantitativa precisa de unidades. Esta podría obtenerse, por ejemplo, mediante más ubicaciones diferenciadas de captura en las regiones de captura o midiendo u observando la intensidad de la formación de un color o midiendo u observando un cambio de color.

45 En la presente memoria se mencionan ventajas adicionales de la presente invención.

**Aspectos generales**

- 5 En un aspecto, el dispositivo de ensayo comprende una región de colocación en la que puede colocarse una muestra. Preferentemente, la muestra es una muestra líquida. Preferentemente, la misma es una muestra alimentaria o de pienso o una muestra que comprende un componente alimentario o de pienso. Hay una matriz operativamente conectada a la región de colocación de modo que la muestra pueda migrar de la región de colocación a lo largo de la matriz. Preferentemente, la matriz es un material tal como la nitrocelulosa.
- 10 La matriz del dispositivo de ensayo de la presente solicitud comprende al menos una ubicación diferenciada de captura que está alejada de la región de colocación. La muestra puede migrar a través de la ubicación de captura. Preferentemente se usan al menos dos ubicaciones de captura. Preferentemente se usan al menos tres ubicaciones de captura. Preferentemente se usan tres ubicaciones de captura.
- 15 En cada ubicación de captura en el dispositivo de ensayo de la presente invención, hay presentes medios de captura. Los medios de captura son capaces de unirse a la enzima que ha de ser detectada por el dispositivo de ensayo. Se retiene al menos una muestra de la enzima en al menos una ubicación de captura. Los medios de captura son, preferentemente, anticuerpos, siendo lo más preferible que los medios de captura sean anticuerpos que se unan a la enzima. Los anticuerpos pueden ser suscitados contra la propia enzima o contra un componente de la misma (por ejemplo, un fragmento de la misma y/o un epítipo de la misma).
- 20 En el dispositivo de ensayo de la presente invención se usan medios de indicación selectiva que comprenden un reactivo o especie reactiva para proporcionar una indicación selectiva de la presencia de enzima activa unida a los medios de captura. Preferentemente, el medio de indicación selectiva comprende una reacción de precipitación y/o proporciona un cambio medible en la longitud de onda visible o UV que se produce tras la formación del producto. El cambio de color puede ser causado por la reacción de un sustrato con la enzima. La reacción con un sustrato indica que la enzima está activa y no meramente presente de forma inactiva o desnaturalizada.
- 25 Preferentemente, un cambio de color visible significa un cambio de color que puede ser observado a simple vista o mediante un lector mecánico y/o mediante un lector electrónico.
- 30 La totalidad o al menos algunos de los componentes de los medios de indicación selectiva están presentes en el dispositivo de ensayo. Para algunas realizaciones, todos los medios de indicación selectiva están presentes en y/o sobre el dispositivo de ensayo. En otras realizaciones, el dispositivo de ensayo comprende al menos uno de los componentes de los medios de indicación selectiva y al dispositivo se le suministran (por ejemplo, como un equipo de reactivos) el o los otros componentes de los medios de indicación selectiva. Así, en uso, el usuario tiene todos los componentes necesarios del medio de indicación selectiva para usar el dispositivo para detectar la enzima activa en el ensayo.
- 35 La presente invención es ventajosa, dado que proporciona un ensayo novedoso y simple que puede ser usado para detectar una enzima activa. Esto resulta particularmente útil en las industrias del bioetanol, de detergentes y de alimentos y pienso, en las que la presencia de enzimas puede ser detectada usando ensayos actualmente disponibles, pero que pueden ser inaccesibles; por ejemplo, debido a la inactivación debida al calor o a un tratamiento químico. Además, los ensayos y los métodos de la invención pueden ser útiles para determinar si se precisa enzima activa adicional de un aditivo alimentario o para pienso. Tal método también podría ser usado para el control de calidad de un producto, tal como un producto alimentario o de pienso.
- 40 La presente invención facilita un método para determinar de forma semicuantitativa la cantidad de enzima activa en una muestra. Preferentemente, este planteamiento semicuantitativo es relativo al número de regiones de captura que indican la presencia de enzima unida.
- 45 La presente invención facilita un método para determinar los niveles de enzima activa en un alimento o un pienso, y un método para determinar si se precisa enzima adicional o un aditivo alimentario o para pienso. Tal método también podría ser usado para el control de calidad de un producto, tal como un producto alimentario o de pienso.
- 50 La presente invención puede presentarse en forma de un equipo de reactivos. Tal equipo de reactivos permitirá al operario llevar a cabo el ensayo, preferentemente fuera del laboratorio. El equipo de reactivos puede proporcionar todos los reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo. La totalidad o algunos de tales reactivos pueden estar en forma seca.
- Preferentemente, la enzima activa detectada por el ensayo o por el dispositivo de ensayo de la presente invención es una fosfatasa o un glucósido hidrolasa, preferentemente una fosfatasa ácida, una fitasa, una xilanasas, una amilasa, o una  $\beta$ -glucanasa.
- En un aspecto más preferente, la enzima activa detectada por el ensayo o por el dispositivo de ensayo de la presente invención es una fosfatasa, preferentemente una fosfatasa ácida, más preferentemente una fitasa.

El término “fitasa” significa una proteína o polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico, incluyendo fitato/ácido fítico, y desprender fosfato inorgánico. Algunas fitasas, además del fitato, son capaces de hidrolizar al menos algunos de los inositol-fosfatos de grados intermedios de fosforilación.

- 5 La fracción no feculenta de polisacáridos (NSP) de algunos cereales, como el trigo y la cebada, aumenta la viscosidad en el intestino, lo que compromete la difusión de nutrientes. Este efecto antinutritivo puede reducirse por la adición de xilanasas y/o beta-glucanasa, que fragmentan los polímeros de hemicelulosa, xilano y beta-glucano, respectivamente.

Se añaden al pienso alfa-amilasas, entre otros suplementos, para mejorar la utilización de la fécula del pienso.

- 10 Al pienso para animales se añaden enzimas fitasa, como, por ejemplo, la 6-fitasa BP17, derivada de *Buttiauxella sp.*, para aumentar la disponibilidad de fosfato, aumentando así el valor nutricional del producto. El procesamiento del pienso —por ejemplo, con calor y a alta presión— puede desnaturalizar a la fitasa y reducir su actividad. La presente invención proporciona un ensayo semicuantitativo que puede dar específicamente una indicación de los niveles de posprocesamiento de la actividad de la fitasa presente en el pienso.

En un aspecto muy preferente, la enzima activa detectada por la presente invención es una fitasa, más en particular una 6-fitasa.

- 15 En un aspecto muy preferente, la enzima activa que ha de ser detectada es la BP17. La BP17 es una variante enzimática de una fitasa de *Buttiauxella sp.* La secuencia de la BP17 (excluyendo el péptido señal) es la siguiente:

```
NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWPKVLYITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
YVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQONLEKADPLFHPVKAGICSMCKTQVQQAVEKEAQTPI DNLNQHYI PSLALMNT
TLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNIHSEQEWALLLKLHNV
YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAI SNALNPNATE SKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFER
LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCLSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ
```

En otra realización, la enzima activa que ha de ser detectada es la BP11. La BP11 es una variante enzimática de una fitasa de *Buttiauxella sp.* La BP11 se usa en la producción de bioetanol. La secuencia de la BP11 (excluyendo el péptido señal) es la siguiente:

```
NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWPKVLYITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILSQGSCPTPNSI
YVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQONLEKADPLFHPVKAGICSMCKTQVQQAVEKEAQTPI DNLNQHYI PSLALMNT
TLNFSKSPWCQKHSADKSCDLGLSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNIHSEQEWALLLKLHNV
YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAI SNALNPNATE SKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFER
LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCLSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ
```

- 20 En otra realización, la enzima activa que ha de ser detectada es la BP111. La BP111 es una variante enzimática de una fitasa de *Buttiauxella sp.* La BP111 se usa en la producción de bioetanol. La secuencia de la BP111 (excluyendo el péptido señal) es la siguiente:

```
NDTPASGYQVEKVVILSRHGVRAPTKMTQTMRDVTPTNTWPEWPKVLYITPRGEHLISLMGGFYRQKFQQQGILPRGSCPTPNSI
YVWTDVAQRTLKTGEAFLAGLAPQCGLTIHHQONLEKADPLFHPVKAGICSMCKTQVQQAVEKEAQTPI DNLNQRYI PELALMNT
ILNFSKSPWCQKHSADKPCDLALSMPSKLSIKDNGNEVSLDGAIGLSSTLAEIFLLEYAQGMPQVAWGNIHSEQEWALLLKLHNV
YFDLMERTPYIARHKGTPLLQAI SNALNPNATE SKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGMLNMRWTLPGQPDNTPPGGALVFER
LADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTPLSLNQPPGSVQLKIPGCNDQTAEGYCLSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ
```

### Breve descripción de las Figuras

Ahora se describirá la presente invención por referencia a las Figuras siguientes:

- 25 **Figura 1** - presenta dos diagramas.

**Figura 2** - presenta un diagrama (Formato 1: Ensayo de captura enzimática y sustrato de precipitación).

**Figura 3** - presenta una serie de fotografías (etapas implicadas en el formato semiseco).

**Figura 4** - presenta una fotografía (resultados de una serie de disoluciones de fitasa BP17 usando el formato semiseco).

- 30 **Figura 5** - presenta un diagrama (Formato 2: Ensayo de fase doble de anticuerpo conjugado con oro).

**Figura 6** - presenta una serie de fotografías (un ejemplo de un ensayo de formato seco).

**Figura 7** - presenta una serie de fotografías (resultados para muestras preparadas en tampón acetato, agua Milli-Q y agua de grifo).

**Figura 8** - presenta una serie de fotografías (muestreo a diferentes intervalos temporales).

- 35 **Figura 9** - presenta una serie de fotografías (SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia de muestras de pienso y fitasa purificada BP17).

- Figura 10** - presenta una serie de fotografías (comparación del formato de doble fase con oro y el formato de actividad enzimática en sustrato de precipitación usando el inhibidor MIHS específico a la fitasa BP17).
- Figura 11** - presenta un diagrama y una fotografía (representación esquemática del formato de flujo pasante).
- Figura 12** - presenta un diagrama (representación esquemática del formato de tira reactiva).
- 5 **Figura 13** - presenta una fotografía (resultados del ensayo de formato de tira reactiva)
- Figura 14** - presenta un diagrama (representación esquemática del formato de tira reactiva absorbente).
- Figura 15** - presenta una serie de fotografías (resultados del ensayo de formato de tira reactiva absorbente).
- Figura 16** - presenta una serie de fotografías (resultados del ensayo de formato de tira reactiva absorbente usando diferentes agentes de bloqueo).
- 10 **Figura 17** - presenta una serie de fotografías (variando la concentración de la línea de ensayo para modular la naturaleza semicuantitativa del ensayo. Formato de tira reactiva absorbente).
- Figura 18** - presenta una serie de fotografías (comparación entre NBT e INT usando el formato de tira reactiva absorbente).
- Figura 19** - presenta una serie de fotografías (sometimiento a ensayo de una amplia gama de tipos de nitrocelulosa para determinar el más apropiado).
- 15 **Figura 20** - presenta una fotografía (prueba de reducción de la concentración del agente de bloqueo caseína en presencia de un tensioactivo (Tween-20)).
- Figura 21** - presenta una serie de fotografías (adición de los reactivos de bloqueo directamente sobre la nitrocelulosa del soporte de ensayo para comprobar si podían obtenerse resultados satisfactorios).
- 20 **Figura 22** - presenta una serie de fotografías (una serie de disoluciones de concentraciones de fitasa BP17 sometidas a ensayo con NC bloqueada únicamente con tensioactivo con sustratos tanto de INT como de NBT para comprobar la sensibilidad de este método).
- Figura 23** - presenta una serie de fotografías (sometimiento a ensayo del secado y el almacenamiento de diversos componentes de sustrato mezclados entre sí).
- 25 **Figura 24** - presenta una serie de fotografías (comparación entre el formato semiseco y el formato de todo en solución).
- Figura 25** - presenta una serie de fotografías (el sometimiento de soluciones a ensayo periódico en busca de actividad sugiere que la solución de tetrazolio tiene buena estabilidad).
- Figura 26** - presenta una fotografía de soluciones de ensayo para la actividad de la xilanasas.
- Figura 27** - presenta una fotografía de soluciones de ensayo para la actividad de la xilanasas.
- 30 **Figura 28** - presenta un diagrama esquemático para realizar un ensayo de actividad de la xilanasas activa.
- Figura 29** - presenta una serie de diagramas esquemáticos.

#### Descripción detallada

La presente invención proporciona un dispositivo para la detección de una enzima activa. El dispositivo puede ser usado en el laboratorio y también fuera del laboratorio en campos diversos.

- 35 La presente invención proporciona un dispositivo (1) de ensayo para detectar una enzima activa en una muestra. El dispositivo (1) de ensayo comprende los siguientes componentes: (a) una región (10) de colocación en la que puede colocarse la muestra; (b) una matriz (20) operativamente conectada a dicha región (10) de colocación, de modo que la muestra, cuando esté presente (tal como colocada) en dicha región (10) de colocación pueda migrar a lo largo de dicha matriz (20); (c) al menos una ubicación diferenciada (30) de captura en dicha matriz (20), estando cada ubicación diferenciada (30) de captura alejada de la región (10) de colocación, y pudiendo migrar la muestra a través de dicha ubicación diferenciada (30) de captura; (d) medios (40) de captura que están presentes en cada ubicación diferenciada (30) de captura o que la definen, siendo dichos medios (40) de captura capaces de unirse con dicha enzima, de modo que al menos una porción de dicha muestra de dicha enzima quede retenida en al menos una ubicación diferenciada (30) de captura; (e) un medio (50) de indicación selectiva o al menos un componente del mismo para proporcionar una indicación selectiva de la presencia de la enzima activa unida a dichos medios (40) de captura, comprendiendo el medio de indicación selectiva un reactivo o especie reactiva; y (f) un sustrato de dicha enzima, estando unido dicho sustrato al dispositivo (1) de ensayo; en el que dicha enzima actúa sobre dicho sustrato para generar un resto reactivo; en el que, además, dicho resto reactivo actúa sobre dicho reactivo o especie reactiva para generar un efecto funcional.
- 40
- 45

5 Detectar la presencia de una enzima activa, y la cantidad de tal enzima, es de particular importancia en el campo alimentario y de los piensos. La ausencia de enzima activa puede llevar potencialmente a deficiencias en nutrientes y minerales en los seres humanos y los animales que ingieren los alimentos o el pienso. La capacidad de detectar la presencia de una enzima puede no ser igual que la capacidad de detectar la presencia de una enzima activa usando los métodos existentes.

10 Como ejemplo particular, el fitato es la principal forma de almacenamiento de fósforo en los cereales y las legumbres. Sin embargo, los animales monogástricos, tales como el cerdo, las aves de corral y los peces, no son capaces de metabolizar o absorber fitato (o ácido fítico) y, por lo tanto, es excretado, lo que lleva a una contaminación de fósforo en áreas de intensa producción ganadera. Además, el ácido fítico también actúa como agente antinutritivo en animales monogástricos, al quelar agentes metálicos tales como el calcio, el cobre y el cinc.

15 A través de la acción de la fitasa, el fitato es generalmente hidrolizado, dando inositol-fosfatos inferiores y fosfato inorgánico. Las fitasas son útiles como aditivos en piensos para animales, en los que mejoran la disponibilidad de fósforo orgánico para el animal y disminuyen la contaminación del entorno por fosfato (Wodzinski RJ, Ullah AH. Adv Appl Microbiol. 42, 263-302 (1996)). Sin embargo, si la fitasa contenida en un pienso es inactiva, esta no tendrá efecto hidrolizante alguno de la fitasa, lo que podría llevar a la malnutrición en los animales. Por lo tanto, la presente invención permite a un operario, tal como un ganadero, un granjero, un veterinario, un cuidador de zoológico, un productor de aditivos para pienso, un productor de pienso, un científico o un miembro del público, analizar un pienso para animales para ver si contiene una enzima activa, tal como, por ejemplo, fitasa, y la cantidad de enzima activa, tal como la fitasa.

20 La presente invención también podría ser usada en un método de control de calidad en la preparación de piensos o alimentos, en la producción de biocombustibles o composiciones detergentes a los que se ha añadido una enzima, tal como una fosfatasa o un glucósido hidrolasa, preferentemente una fosfatasa ácida, una fitasa, una xilanasa, una amilasa, o una  $\beta$ -glucanasa.

### Ensayos y dispositivos

25 La expresión "dispositivo de ensayo", usada en la presente memoria, significa un aparato, una colección de aparatos o un equipo.

En la Figura 1 se muestra un dispositivo o aparato de ensayo que comprende las características enumeradas en (a) a (f) en lo que antecede.

Con referencia a la Figura 1, el dispositivo (1) de ensayo de la presente invención es mostrado como dos realizaciones, presentadas en la Figura 1(a) (realización 1) y en la Figura 1(b) (realización 2).

30 En ambas realizaciones, el dispositivo (1) de ensayo comprende una región (10) de colocación operativamente conectada a la matriz (20). En la matriz (20) hay presenta al menos una ubicación diferenciada (30) de captura. Hay presentes medios (40) de captura en cada ubicación diferenciada (30) de captura o la definen. En uso, el operario coloca la muestra en la región (10) de colocación y la muestra migra a lo largo de la matriz (20) en la dirección mostrada por las flechas. En la realización 1, los medios (50) de indicación selectiva (no mostrados), o al menos un componente de los mismos (no mostrado), están añadidos o constituidos en la ubicación (30) de captura. En un aspecto, el medio de indicación selectiva comprende un reactivo (especie reactiva) que puede generar un cambio observable de color cuando la enzima activa ha reaccionado con un sustrato. En ese aspecto, el reactivo puede ser suministrado en forma líquida al dispositivo en uso.

40 La realización 2 del dispositivo (1) de ensayo funciona de la misma forma que la realización 1. Sin embargo, en este caso el dispositivo (1) de ensayo consiste en dos mitades opuestas (2) y (3) que están unidas por la sección de plegado o línea (70) de pliegue. La región (10) de colocación, conectada operativamente a la matriz (20) está colocada en una mitad (2) del dispositivo. La o las ubicaciones (30) de captura y los medios (40) de captura están colocados en la matriz (20). La misma mitad (3) o la opuesta del dispositivo comprende el medio de indicación selectiva o al menos un componente del mismo, y la mitad opuesta (3) comprende opcionalmente una almohadilla absorbente para absorber la muestra sobrante (60).

45 El medio (50) de indicación selectiva, o al menos un componente del mismo, de la realización 2 es puesto en contacto con la matriz (20) y los medios (40) de captura cuando el operario pliega la línea (70) de pliegue. Puede ser preciso que el operario añada el medio (50) de indicación selectiva o algún o algunos componentes del medio (50) de indicación selectiva al dispositivo en forma líquida. Alternativamente, el medio de indicación selectiva o al menos algunos componentes del medio de indicación selectiva pueden estar presentes en forma seca en la posición (90).

Opcionalmente preferida, la realización 2 comprende una ventana (80) de visualización que permite al operario ver el resultado del dispositivo de ensayo (en otras palabras, ver las ubicaciones de captura) una vez se cierran las dos mitades (2) y (3) del dispositivo. La ventana (80) de visualización puede estar fabricada de un material plástico o puede ser una abertura abierta.

55 En la realización 2, una o cada una de las mitades (2, 3) puede estar fabricada de materiales plásticos o de cartulina, lo suficientemente rígidos para proporcionar soporte.



Según se ha mencionado, el dispositivo (1) de ensayo comprende una región de colocación en la que puede colocarse una muestra. Preferentemente, la muestra es una muestra líquida. La matriz (20) está operativamente conectada a la región (10) de colocación, de modo que la muestra pueda migrar de la región (10) de colocación a lo largo de la matriz (20). Preferentemente, la matriz (20) es un material que permita que la muestra migre, tal como, por ejemplo, nitrocelulosa. La matriz (20) del dispositivo (1) de ensayo de la presente solicitud comprende al menos una ubicación diferenciada (30) de captura que está alejada de la región (10) de colocación. La muestra puede migrar a través de la ubicación (30) de captura. Preferentemente, se usan tres ubicaciones (30) de captura. En cada ubicación (30) de captura en el dispositivo (1) de ensayo de la presente invención, hay presentes medios (40) de captura. Los medios (40) de captura son capaces de unirse a la enzima que ha de ser detectada por el dispositivo (1) de ensayo. Al menos una muestra de la enzima queda retenida en al menos una ubicación (30) de captura. Los medios (40) de captura son, preferentemente, anticuerpos, y lo más preferible es que los medios (40) de captura sean anticuerpos que se unan a la enzima. Los anticuerpos pueden ser suscitados contra la propia enzima o contra un componente de la misma (por ejemplo, un fragmento de la misma y/o un epítipo de la misma).

En el dispositivo (1) de ensayo de la presente invención se usan medios de indicación selectiva que comprenden un reactivo o especie reactiva (50) para proporcionar una indicación selectiva de la presencia de enzima activa unida a los medios (40) de captura. Preferentemente, el medio de indicación selectiva o al menos un componente del mismo está en la posición (90) en la mitad del dispositivo (1) de ensayo opuesta a la matriz (20). Preferentemente, el medio (50) de indicación selectiva comprende una reacción de precipitación y/o proporciona un cambio visible de color. El cambio de color puede ser causado por la reacción de un sustrato con la enzima. La reacción con un sustrato indica que la enzima está activa y no meramente presente de forma inactiva o desnaturalizada.

En un aspecto preferido, el dispositivo es semicuantitativo, en el sentido de que la cantidad de enzima activa (cantidad de analito) está indicado por el número de ubicaciones (30) de captura del dispositivo que muestran un cambio de color y/o por la intensidad del cambio de color en la o las ubicaciones de captura si el medio de indicación selectiva genera un cambio de color cuando la enzima activa está presente.

El dispositivo (1) de ensayo de la presente invención comprende, preferentemente, varias regiones que están operativamente conectadas. Las regiones incluyen, preferentemente, una región (10) de colocación. Los más preferible es que el dispositivo (1) de ensayo de la presente invención sea un dispositivo de flujo lateral.

El dispositivo (1) de ensayo de la presente invención puede comprender opcionalmente una "región indicadora" o "línea indicadora" (91) que indique si el dispositivo de ensayo ha funcionado correctamente. Preferentemente, la región o línea indicadora indica, a través de un color o de un cambio de color, que el ensayo ha funcionado. La región o línea indicadora opcional puede comprender anticuerpos. Estos anticuerpos pueden ser suscitados contra la propia enzima o contra un componente de la misma (por ejemplo, un fragmento de la misma y/o un epítipo de la misma), no teniendo relación dicha enzima con la enzima activa que ha de detectarse. Además, o alternativamente, la línea indicadora puede comprender una enzima relacionada o no relacionada, que puede reaccionar con al menos algunos de los componentes del sustrato. En una realización de la invención, el dispositivo y el ensayo son usados para detectar la enzima fitasa activa. En tal caso, la enzima relacionada o no relacionada en la línea indicadora puede ser una enzima que tenga actividad de fosfatasa. A título de ejemplo, la línea indicadora puede comprender una enzima relacionada o la misma enzima que ha de ser detectada; por ejemplo, la línea indicadora puede comprender BP17 fitasa en un ensayo para la detección de BP17 fitasa. A título de ejemplo adicional, la línea indicadora puede comprender una enzima y un anticuerpo, pudiendo ser el anticuerpo específico a la enzima de la línea indicadora o a otra enzima.

Un "ensayo" es el análisis de la composición química o de la intensidad de una sustancia. Esto puede incluir la detección de un constituyente particular en una mezcla. El dispositivo (1) de ensayo es usado para llevar a cabo el ensayo de la invención, que es para detectar una enzima activa.

Los términos "inmunoensayo" y "ensayos" son usados de forma intercambiable en esta solicitud, pudiendo abarcar el término "ensayo" al "inmunoensayo". Un inmunoensayo es una forma particular de ensayo que usa la unión específica entre un antígeno y su anticuerpo para identificar una sustancia en una muestra.

El dispositivo de ensayo puede comprender, preferentemente, un reactivo de bloqueo, o puede añadirse un reactivo de bloqueo al dispositivo.

La expresión "reactivo de bloqueo" se refiere a un agente que modula la interacción de la enzima activa que ha de ser detectada (es decir, los analitos) con los medios de captura, preferentemente comprendiendo los medios de captura anticuerpos. El reactivo de bloqueo permite el movimiento de la muestra a lo largo de la matriz del dispositivo para que toda la muestra no sea bloqueada por el primer medio de captura. El reactivo de bloqueo puede comprender o no un tensioactivo. Ejemplos de reactivos de bloqueo o componentes de reactivos de bloqueo adecuados incluyen caseína y Dehqart CC6

La matriz (20) puede comprender el reactivo de bloqueo. Alternativamente, el reactivo de bloqueo o un componente del mismo puede ser añadido al dispositivo. El reactivo de bloqueo puede ser añadido en los componentes (30) del dispositivo de ensayo, o cerca o incluso alejado de los mismos. El reactivo de bloqueo puede unirse a la matriz (20) o

ser aplicado en una almohadilla a la matriz (20). El agente de bloqueo puede estar en forma seca y/o en forma deshidratada.

### Enzimas

5 El término “enzima”, usado en la presente memoria, se refiere a una proteína que cataliza las reacciones químicas de otras sustancias sin ser ella misma destruida ni alterada al completarse las reacciones.

10 La enzima detectada por la presente invención puede ser una forma natural, que es una enzima presente en la naturaleza, o una variante. Una “variante” es una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una o varias inserciones, deleciones y/o sustituciones con respecto a la secuencia madre de la que se deriva la variante de tal enzima de tipo natural o incluso de una enzima variante, y que retiene una propiedad funcional y/o potencia una propiedad —por ejemplo, una actividad potenciada— de la enzima. Según se usa en la presente memoria, la expresión “secuencia de aminoácidos” es sinónima del término “polipéptido” y/o del término “proteína”.

La expresión “enzima activa”, usada en la presente memoria, se refiere a una enzima que retiene su función catalítica. Por ejemplo, la fitasa es capaz de catalizar la hidrólisis de los ésteres de ácido fosfórico.

15 La expresión “enzima inactiva” se refiere a una enzima que está presente en una muestra, pero que es incapaz de llevar a cabo su función catalítica. La inactivación puede producirse debido a la desnaturalización de la enzima, debido a un tratamiento térmico o debido a un tratamiento químico, o a un tratamiento o procesamiento por parte de otra enzima, tal como la proteólisis por parte de una proteasa o la desglicosilación por parte de una glicosidasa. La inactivación también puede ser debida a un inhibidor química. En caso de que la enzima sea una fitasa, tal como, por ejemplo, la fitasa BP17, un inhibidor que puede usarse es el hexasulfato de mioinositol (MIHS).

20 Ejemplos de enzimas detectadas por la presente invención incluyen fosfatasas y glucósidos hidrolasa.

25 Las fosfatasas o hidrolasas de monoéster fosfórico (EC 3.1.3) son enzimas capaces de liberar grupos fosfato de su sustrato. Fosfatasas útiles incluyen, sin limitación, la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1), la fosfatasa ácida (EC3.1.3.2), la 3-fitasa (EC 3.1.3.8) o la 6-fitasa (EC 3.1.3.26). Preferentemente, la enzima detectada por el dispositivo de ensayo de la presente invención es una fitasa. Preferentemente, la enzima es 6-fitasa, y lo más preferible es que la enzima sea la 6-fitasa (BP17) derivada de *Buttiauxella sp.*

30 La 6-fitasa también es denominada “4-fitasa” o “fitato 6-fosfatasa”. Fitasas adicionales incluyen las fitasas ácidas de histidina (HAP), que son un grupo que comprende miembros hallados entre procariotas (por ejemplo, la appA fitasa de *Escherichia coli*) y eucariotas (phyA y B de *Aspergillus sp.*, las HAP fitasas de la levadura) y plantas. Las HAP fitasas comparten un motivo común de sitio activo, RHGXRXP, en el extremo N-terminal y un motivo HD en el extremo C-terminal en sus secuencias de ADN. Esto permite un mecanismo de dos etapas en la hidrólisis de los fosfomonoésteres. La phyA y la phyB de *A. niger* y la appA de *E. coli* son los representantes que han sido más caracterizados.

35 En un aspecto preferido, la enzima es una fitasa y la actividad de la enzima activa es determinada por la reducción de una especie reactiva —tal como una sal de tetrazolio— para producir un efecto visualmente observable, tal como un precipitado visualmente observable que puede estar coloreado. El dispositivo es semicuantitativo y la cantidad de analito es indicada por el número de ubicaciones (30) de captura del dispositivo que presentan un cambio de color debido al precipitado. La reducción del tetrazolio que produce color es, en esencia, una medida indirecta de la acción de la enzima fosfatasa sobre su propio sustrato. En este sentido, se genera un agente o resto reactivo reductor que, a continuación, actúa sobre el tetrazolio para generar una tinción de formazano.

40 En una realización, la enzima detectada por la presente invención es una 6-fitasa de, por ejemplo, *Buttiauxella sp.*, *Trichoderma reesei*, *E. coli*, *Aspergillus niger*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Peniphora lycii* o *Penicillium funiculosum*

45 En una realización, la fitasa es una fitasa de *Citrobacter* derivada, por ejemplo, de *Citrobacter freundii*, preferentemente *C. freundii* NCIMB 41247 y variantes de la misma divulgadas, por ejemplo, en los documentos WO2006/038062 y WO2006/038128, *Citrobacter braakii* YH-15, divulgada en el documento WO 2004/085638, *Citrobacter braakii* ATCC 51113, divulgada en el documento WO2006/037328, así como variantes de la misma divulgadas, por ejemplo, en los documentos WO2007/112739 y WO2011/117396, *Citrobacter amalonaticus*, preferentemente *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25405 o *Citrobacter amalonaticus* ATCC 25407, divulgadas en el documento WO2006037327, *Citrobacter gillanii*, preferentemente *Citrobacter gillanii* DSM 13694, divulgada en el documento WO2006037327, o *Citrobacter intermedius*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murliniae*, *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter sedlakii*, *Citrobacter werkmanii*, *Citrobacter youngae*, polipéptidos de la especie *Citrobacter* o variantes de la misma.

En una realización, la fitasa puede ser una fitasa de *Citrobacter*, por ejemplo, de *Citrobacter freundii*, tal como la o las enzimas fitasa enseñadas en el documento WO2006/038128.

55 En algunas realizaciones, la fitasa es, preferentemente fitasa de *E. coli* comercializada con el nombre de Phyzyme XP™ por DuPont Nutrition Biosciences ApS.

Alternativamente, la fitasa puede ser una fitasa de *Buttiauxella*, por ejemplo, una fitasa de *Buttiauxella agrestis*; por ejemplo, las enzimas fitasa enseñadas en los documentos WO 2006/043178, WO 2008/097619, WO09/129489, WO2008/092901 o WO10/122532.

5 En una realización, la fitasa puede ser una fitasa de *Hafnia*, por ejemplo, de *Hafnia alvei*, tal como la o las enzimas fitasa enseñadas en el documento US2008263688.

En una realización, la fitasa puede ser una fitasa de *Aspergillus*, por ejemplo, de *Apergillus oryzae*.

En una realización, la fitasa puede ser una fitasa de *Penicillium*, por ejemplo, de *Penicillium funiculosum*.

10 Se entender que, según se usa en la presente memoria, se define 1 FTU (unidad de fitasa) como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 mmol de ortofosfato inorgánico a partir de un sustrato en un minuto en condiciones de reacción definida en el ensayo de fitasa ISO 2009, en ensayo estándar para determinar la actividad de la fitasa, y puede encontrarse 1 FTU en el estándar internacional ISO/DIS 30024: 1-17, 2009.

15 Alternativamente, según se usa en la presente memoria, se define una unidad de fitasa (FTU) como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de fósforo inorgánico/min a partir de 0,00015 mol/L de fitato sódico a pH 5,5 a 37 grados C (Denbow, L. M., V. Ravindran, E. T. Kornegay, Z. Yi, y R. M. Hulet. 1995. Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. Poult. Sci. 74:1831-1842).

En una realización, la enzima es clasificada, de manera adecuada, usando la clasificación E.C. anterior, ya la clasificación E.C. designa una enzima que tiene esa actividad cuando es verificada en el ensayo enseñado en la presente memoria para determinar 1 FTU.

20 Otro grupo de enzimas que pueden ser detectadas por el dispositivo y el método de ensayo de la presente invención es el grupo de glucósidos hidrolasa (EC 3.2.1), es decir, enzimas que hidrolizan compuestos O y S-glicosilo. Una propiedad común adicional de este grupo de enzimas es que liberan, por ejemplo, un fragmento o producto que tiene un grupo terminal reductor (que contiene un grupo aldehído). Ejemplos de este grupo incluyen xilanasas, tales como endo-1,4-β-xilanasas (EC 3.2.1.8) y endo-1,3-β-xilosidasas de xilano (EC 3.2.1.32), preferentemente 1,4-beta-xilosidasa de xilano (EC 3.2.1.37); α-amilasa (EC 3.2.1.1); β-amilasa (EC 3.2.1.2); oligo-1,6-glucosidasa (EC 3.2.1.10); 1,4-alfa-glucosidasa de glucano (EC 3.2.1.3); pululanasa (EC 3.2.1.41); celulasa (EC 3.2.1.4); endo-1,3(4)-beta-glucanasa (EC 3.2.1.6); o endo-1,3-beta-D-glucosidasa de glucano (EC 3.2.1.39).

Xilanasas es el nombre dado a una clase de enzimas que degradan el polisacárido lineal beta-1,4-xilano formando xilosa, descomponiendo así la hemicelulosa, uno de los componentes fundamentales de las paredes celulares de las plantas.

30 La xilanasas para ser usada en la presente invención puede ser cualquier xilanasas comercialmente disponible.

Adecuadamente, la xilanasas puede ser una endo-1,4-β-d-xilanasas (clasificada como E.C. 3.2.1.8) o una 1,4 3-xilosidasa (clasificada como E.C. 3.2.1.37).

En una realización, la xilanasas es, preferentemente, una endoxilanasas; por ejemplo, una endo-1,4-3-d-xilanasas. La clasificación para una endo-1,4-β-d-xilanasas es E.C. 3.2.1.8.

35 El dispositivo de ensayo y el método de la presente invención también pueden detectar amilasas.

Amilasa es el nombre dado a una clase de enzimas capaces de hidrolizar el almidón formando oligosacáridos de cadena más corta como la maltosa. El resto de glucosa puede ser entonces transferido, pasando de maltosa a un monoglicérido o a un glucosilmonoglicérido con mayor facilidad que partiendo de la molécula de almidón original.

40 El término amilasa incluye α-amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas formadoras de G4 (E.C. 3.2.1.60), β-amilasas (E.C. 3.2.1.2) Y γ-amilasas (E.C. 3.2.1.3).

En una realización, la amilasa es, preferentemente, una α-amilasa. Las α-amilasas están clasificadas como E.C. 3.2.1.1.

Preferentemente, el sustrato es un sustrato de fosfatasa, y lo más preferible es que el sustrato de fosfatasa sea ácido 2-fosfo-L-ascórbico trisódico (AsAP).

#### 45 **Muestra**

El término "muestra", usado en la presente memoria, significa un espécimen o extracción de la sustancia o composición recogida para su análisis para determinar si hay presente enzima activa.

50 La muestra es, preferentemente, un líquido. La muestra es obtenida, preferentemente, colocando, disolviendo, licuando o haciendo puré la sustancia o composición que ha de ser analizada en un disolvente, tal como agua. Preferentemente, la muestra es una muestra acuosa. Pueden usarse agua de grifo o purificada y agua desionizada,

tal como Milli-Q u otra solución acuosa adecuada. Se contempla que pueda necesitarse alguna forma de extracción para preparar la muestra para permitir que la sustancia o composición que haya de analizarse se mezcle con el disolvente, se descomponga y/o se disuelva en el mismo. Puede usarse, por ejemplo, agitación.

5 Se contempla que se produzca un equipo de reactivos en el que el operario llenará un recipiente de extracción de muestras (por ejemplo, un tubo, una bolsa de plástico o un bote) hasta un nivel predeterminado (marcado por una línea en el recipiente) con un alimento o pienso o biocombustible o una composición detergente y luego llenará el tubo hasta una segunda línea con agua, tal como agua de grifo, agua purificada o desionizada. Preferentemente, con posterioridad, el recipiente de extracción es agitado. Esto permitirá que el operario cree la muestra de manera uniforme.

10 La muestra de la presente invención puede derivarse, extraerse o tomarse de un alimento o de pienso, o de una composición alimentaria o de pienso, o de un detergente o de una composición detergente o de etanol o de producción de biocombustibles. Aquí, el término “alimento” es usado en un sentido amplio, y abarca alimentos para ser humanos, así como comida para animales (es decir, pienso). En un aspecto preferente, el alimento es para el consumo humano. En otro aspecto preferente, el alimento es un pienso para animales no humanos.

15 El alimento o pienso puede tener la forma de una solución, o una solución espesa, o de un sólido, tal como gránulos, dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Los términos “alimento” y “pienso” también se pueden referir a un ingrediente alimentario. La muestra de la presente invención puede derivarse, extraerse o tomarse de un ingrediente alimentario.

20 Según se usa en la presente memoria, la expresión “ingrediente alimentario o de pienso” incluye una formulación que es añadida o puede ser añadida a alimentos funcionales o comestibles como un suplemento nutricional y/o un suplemento de fibra. La expresión “ingrediente alimentario o de pienso” aquí usada también se refiere a formulaciones que puedan ser usadas a bajas concentraciones en una amplia variedad de productos para dar efectos funcionales beneficiosos relevantes para el pienso o comestible particular deseado, incluyendo, sin limitación, gelificación, texturización, estabilización, emulsificación, suspensión, y formación y estructuración de películas, mantenimiento de la jugosidad y mejora de la sensación en boca, sin añadir viscosidad.

25 En una realización adicional, “ingrediente alimentario o de pienso” incluye productos alimentarios intermedios, tales como composiciones o masa para mejorar el pan antes de hornearlo. En el área de aplicación para panadería, normalmente se añaden enzimas a las composiciones de masa antes de hornearlas, y, en realizaciones preferentes, la desnaturalización de las enzimas durante el proceso de horneado termina la actividad enzimática ulterior. Por lo tanto, el ensayo enzimático de la presente invención debe realizarse en la masa o en la composición de ingredientes de la masa antes del horneado. En una realización adicional, la presente invención puede ser usada en composiciones alimentarias lácteas que contengan componentes de cereales, preferentemente avena, centeno, arroz, trigo, salvado de trigo o derivados procesados de los mismos. Preferentemente, dicha composición alimentaria láctea es un yogur, queso o una bebida de un cultivo.

35 El ingrediente alimentario puede tener la forma de una solución, o una solución espesa, o de un sólido, tal como gránulos, dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Los términos “alimento” y “pienso” también pueden referirse a un aditivo alimentario. La muestra de la presente invención puede derivarse, extraerse o tomar de un aditivo alimentario.

40 Según se usa en la presente memoria, la expresión “aditivo alimentario o de pienso” incluye formulaciones que mejoran la digestión de alimentos y de piensos para animales. En particular, “aditivo alimentario o de pienso” está relacionado con las fitasas que pueden ser usadas para potenciar la digestión de los fosfatos en alimentos y piensos para animales.

El aditivo alimentario puede tener la forma de una solución, o una solución espesa, o de un sólido, tal como gránulos, dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

45 La composición de pienso y/o el aditivo para pienso pueden comprender uno o más materiales para pienso seleccionados del grupo constituido por a) cereales, tales como granos pequeños (por ejemplo, trigo, cebada, centeno, avena y combinaciones de los mismos) y/o granos grandes, como el maíz o el sorgo; b) productos derivados de cereales, como la harina de gluten de maíz, los solubles de granos secos de destilería (DDGS) (en particular, solubles de granos secos de destilería a base de maíz (cDDGS), salvado de trigo, harinilla de trigo, moyuelos de trigo, salvado de arroz, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, palmiste y pulpa de cítricos; c) proteína obtenida de fuentes tales como soja, girasol, cacahuete, altramuz, guisantes, habas, algodón, canola, harina de pescado, proteína de plasma seco, harina de carne y hueso, proteína de patata, suero de leche, copra, sésamo; d) aceites y grasas obtenidos de fuentes vegetales y animales; e) minerales y vitaminas.

La presente invención es útil para detectar una enzima activa en la producción de biocombustibles, tal como la producción de bioetanol.

55 **Estructura del dispositivo de ensayo**

5 El dispositivo (1) de ensayo de la presente invención comprende una región (10) de colocación. La expresión “región de colocación”, es usada en la presente memoria para referirse a una región del dispositivo (1) de ensayo en la que puede colocarse la muestra. Preferentemente, la región (10) de colocación es una almohadilla absorbente. La región (10) de colocación está operativamente conectada a una matriz (20). La región (10) de colocación puede ser contigua a la matriz (20) o continua con la misma. La región (10) de colocación puede ser una región integral de la matriz (20). Preferentemente, la región (10) de colocación está en un extremo de la matriz (20). Opcionalmente, hay presente una almohadilla absorbente adicional para absorber la muestra sobrante (60).

En el contexto de la presente descripción, “operativamente conectado” significa mutuamente unido, sujeto o en contacto con algo durante la operación del dispositivo.

10 Preferentemente, la matriz (20) es o comprende un material absorbente. Más preferentemente, la matriz (20) es o comprende nitrocelulosa. Por ejemplo, la matriz (20) puede ser o puede comprender nitrocelulosa de los tipos MDI 90 CNPH, MDI SS12 12 $\mu$  o SS12 15 $\mu$ .

15 Cuando está presente o es colocada en la región (10) de muestra, la muestra puede migrar a lo largo de la matriz (20). Preferentemente, la migración es una migración de líquido, tal como por acción capilar. Preferentemente, la migración es en una dirección longitudinal, y los más preferible es que esto ocurra cuando el dispositivo (1) de ensayo es una tira o un bastoncillo. Preferentemente, el bastoncillo o tira está contenido en un soporte.

20 Puede añadirse un reactivo de bloqueo al dispositivo de ensayo. La matriz (20) puede comprender el reactivo de bloqueo. El reactivo de bloqueo puede estar unido a la matriz (20) y el agente de bloqueo puede estar en forma seca o deshidratada. Aquí, “unido” incluye acoplado o adjunto. El reactivo de bloqueo puede estar unido directa o indirectamente a la matriz. El reactivo de bloqueo puede ser cualquier reactivo adecuado de bloqueo. La caseína es un ejemplo de reactivo de bloqueo. El reactivo de bloqueo puede ser o puede comprender un tensioactivo. El reactivo de bloqueo comprende, preferentemente, un tensioactivo. El reactivo de bloqueo es, preferentemente, un tensioactivo no iónico y/o un tensioactivo zwitteriónico. El tensioactivo puede ser, por ejemplo, Tween-20 o Dehqart CC6.

25 El dispositivo (1) de ensayo de la presente invención comprende al menos una ubicación diferenciada (30) de captura sobre la matriz (20). Cada ubicación (30) de captura está alejada de la región (10) de colocación y la muestra puede migrar a través de la o las ubicaciones diferenciadas (30) de captura. “Diferenciada”, según se usa en la presente memoria en este contexto, significa separada de otras ubicaciones (30) de captura.

30 El dispositivo (1) de ensayo de la presente invención puede comprender múltiples ubicaciones diferenciadas (30) de captura, preferentemente más de dos ubicaciones diferenciadas (30) de captura, y lo más preferible es que el dispositivo comprenda tres ubicaciones diferenciadas (30) de captura.

El dispositivo (1) de ensayo puede tener dos o más regiones de ubicación de captura, comprendiendo cada región una o más ubicaciones diferenciadas (30) de captura. Por ejemplo, cuando tiene tres regiones de ubicaciones diferenciadas de captura, puede resultar posible capturar al menos tres tipos diferentes de enzimas, tales como, por ejemplo, fitasa, xilanasas y amilasa en una muestra y en una medición.

35 En cada ubicación (30) de captura hay medios (40) de captura. Los medios (40) de captura en cada ubicación (30) de captura pueden ser diferentes o pueden ser iguales. Los medios (40) de captura son capaces de unirse a la enzima que ha de ser detectada por el dispositivo (1) de ensayo. Esto da lugar a que al menos una muestra o parte de la muestra de la enzima quede retenida en al menos una ubicación diferenciada (30) de captura. La unión entre los medios (40) de captura y la enzima es, preferentemente, resultado de la unión anticuerpo/antígeno. Los medios (40) de captura por sí solos pueden definir la ubicación (30) de captura.

45 La cantidad de medios (40) de captura en cada ubicación diferenciada (30) de captura del dispositivo (1) de ensayo puede ser diferente o igual. La cantidad de medios (40) de captura en cada ubicación diferenciada (30) de captura puede aumentar cuanto más alejada esté la ubicación de la región (10) de colocación. La cantidad de medios (40) de captura en cada ubicación diferenciada (30) de captura puede disminuir cuanto más alejada esté la ubicación de la región (10) de colocación.

En algunas realizaciones, la cantidad de medios (40) de captura en cada ubicación diferenciada (30) de captura del dispositivo (1) de ensayo es sustancialmente igual.

50 El dispositivo (1) de ensayo de la presente invención puede comprender, opcionalmente, una región o línea indicadora (91) que indique si el dispositivo de ensayo ha funcionado correctamente. Preferentemente, la región o línea indicadora indica a través de un cambio de color que el ensayo ha funcionado. La región o línea indicadora opcional puede comprender anticuerpos. Estos anticuerpos pueden ser suscitados contra la propia enzima o contra un componente de la misma (por ejemplo, un fragmento de la misma y/o un epítipo de la misma), no teniendo relación dicha enzima con la enzima activa que ha de detectarse. Además, o alternativamente, la línea indicadora puede comprender una enzima no relacionada que puede reaccionar con al menos algunos de los componentes del sustrato.

55 **Anticuerpos**

Los medios (40) de captura de la presente invención son, preferentemente, anticuerpos que se unen a la enzima activa que ha de ser detectada por el dispositivo (1) de ensayo. Los anticuerpos pueden ser suscitados contra la propia enzima o contra un componente de la misma (por ejemplo, un fragmento de la misma y/o un epítipo de la misma).

5 La región o línea indicadora opcional (91) del dispositivo (1) de ensayo de la presente invención puede comprender anticuerpos.

Lo más preferible es que los medios (40) de captura sean anticuerpos suscitados contra una fitasa o contra un componente de la misma (por ejemplo, un fragmento de la misma y/o un epítipo de la misma), tales como las fitasas BP17, BP11 o BP111.

10 Los anticuerpos pueden ser producidos por técnicas estándar, tales como por inmunización con la enzima de interés, como una mezcla, una muestra purificada o un fragmento de la misma o usando una biblioteca de expresión en fagos.

15 Para los fines de esta invención, el término "anticuerpo", a no ser que se especifique algo distinto, incluye, sin limitación, fragmentos Fab policlonales, monoclonales, quiméricos, monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, así como miméticos de los mismos. Tales fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos enteros que retienen su actividad de unión hacia una sustancia diana, fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')<sub>2</sub>, así como anticuerpos monocatenarios (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Además, los anticuerpos y los fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados.

Para el dispositivo o el ensayo de la presente invención no se prefieren los anticuerpos neutralizantes (es decir, los que inhiben la actividad biológica de los polipéptidos de la sustancia y que son usados comúnmente en la terapéutica).

20 Si se desean anticuerpos policlonales, es inmuniza a un animal deseado (por ejemplo, un ratón, un conejo, una cabra, un caballo, un pollo, etc.) con la enzima que ha de ser detectada (o con un fragmento de polipéptido que comprenda un epítipo inmunológico de la misma). Dependiendo de la especie anfitriona, pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica.

25 Se recoge suero del animal inmunizado y se lo trata según procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales a la enzima que ha de ser detectada por el dispositivo de ensayo de la presente invención, y/o a la secuencia de aminoácidos de esa enzima (o a una secuencia que comprenda un epítipo inmunológico de la misma) contiene anticuerpos a otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden ser purificados por cromatografía de inmunoafinidad. En la especialidad son muy conocidas las técnicas para producir y procesar antisueros policlonales (por ejemplo, Harboe N, Ingild A. Immunization, isolation of immunoglobulins, Estimation of antibody titre. Scand J Immunol Suppl. 1973, 1:161-4). En la sección de Ejemplos, se usó la metodología de Harboe (*ibíd.*) para generar anticuerpos a la enzima fitasa BP17. Sin embargo, podrían usarse otras técnicas y/o podrían usarse otras enzimas para generar anticuerpos adecuados.

35 Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la enzima que ha de ser detectada por el dispositivo (1) de ensayo de la presente invención, y/o contra la secuencia de aminoácidos de esa enzima (o contra una secuencia que comprenda un epítipo inmunológico de la misma) también pueden ser fácilmente producidos por un experto en la técnica e incluyen, sin limitación, la técnica del hibridoma (Koebler y Milstein (1975 Nature 256:495-497), la técnica del hibridoma con linfocitos B humanos (Kosbor et al., (1983) Immunol Today 4:72; Cote et al., (1983) Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030) y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan Rickman Liss Inc., pp. 77-96).

40 Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el empalme de genes de anticuerpos murinos de con genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con especificidad a un antígeno y actividad biológica apropiadas (Morrison et al., (1984) Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855; Neuberger et al., (1984) Nature 312:604-608; Takeda et al., (1985) Nature 314:452-454).

45 Alternativamente, pueden adaptarse las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (US4946779) para producir anticuerpos monocatenarios específicos a la sustancia.

También pueden generarse fragmentos de anticuerpo que contienen sitios de unión específicos para la sustancia. Tales fragmentos incluyen, por ejemplo, sin limitación, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que pueden ser producidos por la digestión con pepsina de la molécula del anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden ser generados reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab para permitir una identificación rápida y sencilla de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse WD et al., (1989) Science 256:1275-1281).

En algunas realizaciones, los anticuerpos son, preferentemente, anticuerpos policlonales.

55 Los anticuerpos pueden ser modificados —por ejemplo, derivatizados— para adaptarse aún mejor al dispositivo o al ensayo. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar acoplado con uno o más restos químicos que permitan una unión/acoplamiento a matrices tales como plásticos derivatizados.

**Medio de indicación selectiva**

El dispositivo de ensayo de la presente invención comprende un medio (50) de indicación selectiva o al menos un componente del mismo para proporcionar una indicación selectiva de la presencia de una enzima activa unida a los medios (40) de captura. El medio (50) de indicación selectiva puede comprender una reacción de precipitación.

- 5 En un aspecto, el dispositivo de ensayo comprende la totalidad o sustancialmente la totalidad del medio de indicación selectiva.

En otro aspecto, el dispositivo de ensayo está dotado de al menos un componente del medio de indicación selectiva. En ese caso, el dispositivo de ensayo está dotado de otro u otros componentes del medio de indicación selectiva. En un aspecto, los medios de indicación selectiva están constituidos sobre y/o en el dispositivo de ensayo cuando el dispositivo de ensayo está en uso. El término "constituido" incluye mezclar o poner en contacto los componentes para generar el medio de indicación selectiva.

- 10

En otro aspecto, se proporciona un equipo de reactivos en el que se proporciona un dispositivo que puede ser usado como dispositivo de ensayo de la presente invención y estando dotado el equipo de reactivos con el medio de indicación selectiva. En uso, la totalidad o algunos de los componentes del medio de indicación selectiva son entonces añadidos al dispositivo para formar el dispositivo de ensayo de la presente invención.

- 15

Los términos "proporcionar", "proporciona", "proporcionado", usados en la presente memoria, se refieren a ser capaz de dar la indicación por sí mismo o como parte de un sistema. Alternativamente, los términos "proporcionar", "proporciona", "proporcionado" se refieren a un equipo de reactivos o a un dispositivo que contiene o comprende el componente identificado.

- 20 El medio (50) de indicación selectiva puede comprender o proporcionar un cambio visible de color. El cambio de color es causado, preferentemente, por la reacción de un sustrato de la enzima para formar un resto que reacciona con una especie reactiva. El sustrato puede estar unido a la matriz (20).

El material sobre el que actúa una enzima es denominado su "sustrato". El sustrato de la enzima está unido al dispositivo (1) de ensayo. Aquí, "unido" incluye acoplado o adjunto. El sustrato puede estar unido directa o indirectamente al dispositivo. Lo más preferible es que el sustrato esté unido a la matriz (20) del dispositivo (1) de ensayo, o puede estar presente en la mitad opuesta (3) del dispositivo en la posición (50). Preferentemente, el sustrato está en forma seca.

- 25

La enzima actúa sobre su sustrato para generar un resto reactivo. Dicho resto reactivo puede actuar entonces sobre una especie reactiva para generar un efecto funcional, preferentemente un efecto observable visualmente, tal como un cambio de color.

- 30

Dicho resto reactivo también puede ser denominado en la presente memoria resto, resto reductor, especie reductora o agente reductor.

El sustrato puede ser un sustrato de fosfatasa o un compuesto con un grupo donador de fosfato. Preferentemente, el sustrato es un sustrato de fosfatasa ácida. Para algunos aspectos, la eliminación del grupo donador de fosfato produce un agente reductor o resto reactivo. Preferentemente, el sustrato de fosfatasa es ácido 2-fosfo-L-ascórbico trisódico (AsAP). Otros ejemplos incluyen análogos, tales como sales ascorbil 2-fosfato alternativas (por ejemplo, de magnesio, cinc, calcio) o el derivado de 3-O-fosfato. Otros ejemplos posibles incluyen versiones esterificadas de ascorbil fosfato (fosfo ascorbil palmitato).

- 35

Cuando el medio (50) de indicación selectiva comprende un cambio de color causado por la reacción de un sustrato de la enzima para formar un resto que reacciona con una especie reactiva, la especie reactiva puede ser un compuesto de tetrazolio. En este sentido, el cambio de color es causado por la formación de una tinción de formazano como consecuencia de la reacción enzimática.

- 40

Las sales de tetrazolio se vienen usando en la industria para eliminar sustancias que alterarían el cambio de color de una reacción redox. Véase, por ejemplo, el documento US 5.196.314. Además, en el documento US 5.360.595, el cambio de color de una sal de tetrazolio fue usado como indicador de la presencia de un analito.

- 45

En la presente invención, la especie reactiva puede ser un compuesto de nitroazul de tetrazolio. La especie reactiva puede ser cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT). Alternativamente, la especie reactiva puede ser un compuesto de halonitrotetrazolio. La especie reactiva puede ser, preferentemente, un compuesto de yodonitrotetrazolio. Preferentemente, la especie reactiva es cloruro de yodonitrotetrazolio (INT).

- 50 Al medio de indicación selectiva, y, con máxima preferencia, a la especie reactiva, puede añadirse una entidad capaz de reducir o prevenir la difusión del precipitado. Esto mejora la calidad del resultado y, con máxima preferencia, mejora las líneas visuales del precipitado. Lo más preferible es que esta entidad sea polietilenglicol y lo más preferible es que este sea añadido a las sales de tetrazolio.

- Así, en un aspecto preferente, se describe un dispositivo (1) de ensayo de flujo lateral que detecta una enzima activa en una muestra. Preferentemente, la enzima es una fosfatasa ácida y la actividad enzimática es determinada por la reducción de una sal de tetrazolio para producir un precipitado coloreado. El dispositivo es semicuantitativo y la cantidad de analito es indicada por el número de ubicaciones (30) de captura del dispositivo que muestran un cambio de color debido al precipitado.
- 5 Cuando el medio (50) de indicación selectiva comprende un sustrato de fosfatasa según se ha descrito en lo que antecede, se puede hacer que el sustrato de fosfatasa reaccione con la especie reactiva, según se ha descrito anteriormente, en presencia de un potenciador de la reacción. El potenciador de la reacción puede estar unido a una matriz secundaria. El potenciador de la reacción puede ser un compuesto de fenacina.
- 10 Preferentemente, el potenciador de la reacción es un compuesto de metosulfato. Lo más preferible es que el potenciador de la reacción sea metosulfato de fenacina (PMS).
- En realizaciones preferentes, la enzima activa que ha de ser detectada actúa sobre el sustrato para generar un resto reactivo o agente reductor que luego actúa sobre una entidad que produce un efecto observable.
- 15 En una realización preferente, la enzima es fitasa, el sustrato es sustrato de fosfatasa o un compuesto con un grupo donador de fosfato.
- En otra realización preferente, la enzima es xilanas, el sustrato es xilano y el resto reactivo es xilosa.
- En otra realización preferente, la enzima es amilasa, el sustrato es almidón y el resto reactivo es glucosa.
- En una realización preferente, la entidad es una sal de tetrazolio y el efecto observable es un efecto visible, siendo lo más preferible que sea un cambio de color.
- 20 **Realizaciones preferentes**
- En la Figura 1a y la Figura 1b se muestran dos realizaciones preferentes del dispositivo (1) de ensayo de la presente invención.
- 25 Preferentemente, el dispositivo (1) de ensayo es una tira o un bastoncillo. A lo largo de la tira o bastoncillo una muestra líquida puede fluir longitudinalmente en la dirección mostrada por las flechas en la Figura 1. El cuerpo de la tira o bastoncillo comprende la matriz (20). Como en la realización 1 del dispositivo (Figura 1a), la región (10) de colocación está, preferentemente, en un extremo de la tira o bastoncillo. Las ubicaciones (30) de captura están, preferentemente, en el extremo de la tira o bastoncillo opuesto a la región (10) de colocación.
- 30 El medio (50) de indicación selectiva o un componente del mismo puede ser añadido al dispositivo de ensayo cuando está en uso. Preferentemente, estos medios de indicación o al menos un componente de los mismos están en forma líquida. Preferentemente, todos los reactivos están secos, salvo el medio (50) de indicación selectiva o algún componente del medio (50) de indicación selectiva. Alternativamente, todos los reactivos pueden estar en forma seca o deshidratada.
- 35 En la Figura 1b se muestra la realización preferente 2 del dispositivo (1) de ensayo. En este caso, el dispositivo (1) de ensayo consiste en dos mitades opuestas que están conectadas por una sección de plegado o línea (70) de pliegue. La región (10) de colocación, conectada operativamente a la matriz (20), está situada en una mitad (2) del dispositivo. La o las ubicaciones (30) de captura y los medios (40) de captura están colocados en la matriz (20). La misma mitad (2) o la opuesta (3) del dispositivo comprende el medio de indicación selectiva, o al menos un componente del mismo, y, opcionalmente, la mitad opuesta (3) comprende una almohadilla absorbente para absorber la muestra sobrante (60).
- 40 Cuando usa la realización 2, el operario coloca la muestra en la región (10) de colocación. A continuación, deja que la muestra fluya hasta al menos una posición requerida. Luego cierra el dispositivo a lo largo de la sección (70) de plegado. Esto pone el medio (50) de indicación selectiva, o al menos un componente del mismo, en contacto con la matriz (20) y los medios (40) de captura. Puede ser preciso que el operario añada el medio (50) de indicación selectiva o algún o algunos componentes del medio (50) de indicación selectiva al dispositivo en forma líquida.
- 45 Para algunas realizaciones, el medio de indicación selectiva o algunos componentes del medio de indicación selectiva pueden estar presentes en forma seca en la posición (90). Preferentemente, todos los reactivos son secos. En algunas realizaciones, el operario puede añadir una solución de tetrazolio ya sea de INT o NBT a la posición (50) o (30).
- 50 La realización 2, opcionalmente preferida, comprende una ventana (80) de visualización que permite al operario ver el resultado del dispositivo de ensayo (en otras palabras, ver las ubicaciones de captura) una vez que se cierran las dos mitades (2) y (3) del dispositivo.
- El dispositivo (1) de ensayo de la presente invención puede comprender opcionalmente una región o línea indicadora que indique si el dispositivo de ensayo ha funcionado correctamente. Preferentemente, la región o línea indicadora indica a través de un cambio de color que el ensayo ha funcionado. La región o línea indicadora opcional puede



comprender anticuerpos. Estos anticuerpos pueden ser suscitados contra la propia enzima o contra un componente de la misma (por ejemplo, un fragmento de la misma y/o un epítipo de la misma), no teniendo relación dicha enzima con la enzima activa que ha de detectarse. Además, o alternativamente, la línea indicadora puede comprender una enzima relacionada o no relacionada, que puede reaccionar con al menos algunos de los componentes del sustrato.

5 Además, o como alternativa, la región indicadora puede comprender una fosfatasa ácida o una fitasa no relacionada con la fitasa que ha de ser detectada.

En una realización, la presente invención proporciona un dispositivo de ensayo para detectar una enzima activa en una muestra, comprendiendo el dispositivo: (a) una región de colocación en la que puede colocarse la muestra; (b) una matriz operativamente conectada a dicha región de colocación, de modo que la muestra, cuando esté presente (tal como colocada) en dicha región de colocación pueda migrar a lo largo de dicha matriz; (c) al menos una ubicación diferenciada de captura en dicha matriz, estando cada ubicación diferenciada de captura alejada de la región de colocación, y pudiendo migrar la muestra a través de dicha ubicación diferenciada de captura; (d) medios de captura que están presentes en cada ubicación diferenciada de captura o que la definen, siendo dichos medios de captura capaces de unirse con dicha enzima, de modo que al menos una porción de dicha muestra de dicha enzima quede retenida en al menos una ubicación diferenciada de captura; (e) un medio de indicación selectiva o al menos un componente del mismo para proporcionar una indicación selectiva de la presencia de la enzima activa unida a dichos medios de captura, comprendiendo el medio de indicación selectiva un reactivo o especie reactiva; y (f) un sustrato de dicha enzima, estando unido dicho sustrato al dispositivo de ensayo; en el que dicha enzima actúa sobre dicho sustrato para generar un resto reactivo; en el que, además, dicho resto reactivo actúa sobre dicho reactivo o especie reactiva para generar un efecto funcional.

Preferentemente, la enzima es fitasa.

En un aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo de ensayo para detectar una enzima activa en una muestra, comprendiendo el dispositivo: (a) una región de colocación en la que puede colocarse la muestra; (b) una matriz operativamente conectada a dicha región de colocación, de modo que la muestra, cuando esté presente (tal como colocada) en dicha región de colocación pueda migrar a lo largo de dicha matriz; (c) al menos una ubicación diferenciada de captura en dicha matriz, estando cada ubicación diferenciada de captura alejada de la región de colocación, y pudiendo migrar la muestra a través de dicha ubicación diferenciada de captura; (d) medios de captura que están presentes en cada ubicación diferenciada de captura o que la definen, siendo dichos medios de captura capaces de unirse con dicha enzima, de modo que al menos una porción de dicha muestra de dicha enzima quede retenida en al menos una ubicación diferenciada de captura; (e) un medio de indicación selectiva para proporcionar una indicación selectiva de la presencia de la enzima activa unida a dichos medios de captura, comprendiendo el medio de indicación selectiva un reactivo o especie reactiva; y (f) un sustrato de dicha enzima, estando unido dicho sustrato al dispositivo de ensayo; en el que dicha enzima actúa sobre dicho sustrato para generar un resto reactivo; en el que, además, dicho resto reactivo actúa sobre dicho reactivo o especie reactiva para generar un efecto funcional.

35 Preferentemente, la enzima es fitasa.

En una realización, la presente invención proporciona un dispositivo de ensayo para detectar una enzima activa en una muestra, comprendiendo el dispositivo: (a) una región de colocación en la que puede colocarse la muestra; (b) una matriz operativamente conectada a dicha región de colocación, de modo que la muestra, cuando esté presente (tal como colocada) en dicha región de colocación pueda migrar a lo largo de dicha matriz; (c) al menos una ubicación diferenciada de captura en dicha matriz, estando cada ubicación diferenciada de captura alejada de la región de colocación, y pudiendo migrar la muestra a través de dicha ubicación diferenciada de captura; (d) medios de captura que están presentes en cada ubicación diferenciada de captura o que la definen, siendo dichos medios de captura capaces de unirse con dicha enzima, de modo que al menos una porción de dicha muestra de dicha enzima quede retenida en al menos una ubicación diferenciada de captura; (e) un medio de indicación selectiva o al menos un componente del mismo para proporcionar una indicación selectiva de la presencia de la enzima activa unida a dichos medios de captura, comprendiendo el medio de indicación selectiva un reactivo o especie reactiva; y (f) un sustrato de dicha enzima, estando unido dicho sustrato al dispositivo de ensayo; en el que dicha enzima actúa sobre dicho sustrato para generar un resto reactivo; en el que, además, dicho resto reactivo actúa sobre dicho reactivo o especie reactiva para generar un efecto funcional; y en el que la enzima es una fitasa y en el que el medio de indicación selectiva comprende una fosfatasa ácida.

### Semicuantitativo

El dispositivo (1) de ensayo de la presente invención puede proporcionar una medida al menos semicuantitativa de la cantidad de enzima activa en una muestra.

Preferentemente, la cantidad es relativa al número de ubicaciones (30) de captura que indican la presencia de la enzima unida. Alternativamente, la medición semicuantitativa puede realizarse usando la intensidad de un cambio de color en la o las ubicaciones (30) de captura.

La intensidad de un cambio de color puede ser evaluada usando una tarjeta de puntuación o tarjeta de referencia, preferentemente en la que el operario compara la intensidad de la reacción de color en la matriz (20) con la tarjeta de

puntuación. Además, o alternativamente, el usuario puede usar un dispositivo electrónico que pueda leer el cambio de color e informar al usuario del resultado o de los resultados de su análisis. A título de ejemplo, el dispositivo electrónico puede ser un teléfono móvil que pueda comprender una aplicación adecuada.

5 La medición semicuantitativa puede determinar si la cantidad de enzima activa está por encima o por debajo de cierta cantidad de concentración; por ejemplo, por encima o por debajo de 300 FTU/g.

### Métodos y usos de la invención

10 Según se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona un método o un uso (por ejemplo, el uso del dispositivo de la presente invención) para determinar si hay una enzima activa presente en una muestra. Preferentemente, este método es semicuantitativo. El método implica el uso del dispositivo (1) de ensayo, descrito en la presente memoria, con una muestra, y comparar los resultados con otras muestras.

Una muestra que contiene más enzima activa hace que más ubicaciones (30) de captura indiquen la presencia de enzima activa unida.

Alternativamente o, además, una muestra que provoque un cambio de color más intenso (por ejemplo, más oscuro) en las ubicaciones de captura contiene más enzima activa.

15 Preferentemente, el método es usado para determinar fosfatasa activa o hidrolasas de monoéster fosfórico (EC 3.1.3) y glucósidos hidrolasa (EC 3.2.1), incluyendo la fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1), la fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2), la 3-fitasa (EC 3.1.3.8), la 6-fitasa (EC 3.1.3.26), la endo-1,4- $\beta$ -xilanasasa (EC 3.2.1.8) y la endo-1,3- $\beta$ -xilosidasa de xilano (EC 3.2.1.32), preferentemente la 1,4-beta-xilosidasa de xilano (EC 3.2.1.37); la  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1), la  $\beta$ -amilasa (EC 3.2.1.2), la oligo-1,6-glucosidasa (EC 3.2.1.10), la 1,4-alfa-glucosidasa de glucano (EC 3.2.1.3), la pululanasa (EC 3.2.1.41), la celulasa (EC 3.2.1.4), la endo-1,3(4)-beta-glucanasa (EC 3.2.1.6), y la endo-1,3-beta-D-glucosidasa de glucano (EC 3.2.1.39). Más preferentemente, se determinan los niveles de 6-fitasa activa, tal como la fitasa BP17.

25 Un aspecto adicional de esta invención es que proporciona un método de determinación de niveles de una enzima activa en una composición alimentaria o de pienso o de biocombustible o de detergente. Este método implica la preparación de una muestra de la composición alimentaria o de pienso o de biocombustible o de detergente, preferentemente una muestra acuosa. A continuación, la muestra es colocada en la región (10) de colocación del dispositivo (1) de ensayo de la invención, y el dispositivo (1) de ensayo es usado para determinar de forma semicuantitativa la cantidad de enzima activa en la muestra. Las cantidades de enzima activa en varias muestras pueden ser comparadas entre sí y/o ser comparadas con una muestra de referencia. Lo más preferible es que este método sea usado para determinar niveles de fitasa activa, preferentemente niveles de fitasa BP17 activa, en un alimento o un pienso.

35 La presente invención proporciona, además, un método para determinar si se precisa enzima adicional o un aditivo alimentario o para pienso. Si se detecta menos de una cantidad especificada o cantidad relativa de enzima activa usando el método anteriormente descrito, esto indica que debería añadirse enzima adicional. Lo más preferible es que este método sea usado para determinar si se debería añadir fitasa adicional, preferentemente fitasa BP17 activa, a un alimento o a un pienso.

40 Los métodos descritos anteriormente pueden ser usados para un control de calidad. Tal método comprende el uso del dispositivo (1) de ensayo de la presente invención para determinar los niveles de la enzima activa en una muestra y luego determinar si estas enzimas satisfacen el nivel del control de calidad de la enzima. Preferentemente tal método podría ser usado para determinar los niveles de fitasa en un pienso o un aditivo para pienso y para determinar luego si ha de usarse el pienso o un aditivo para pienso.

La presente invención proporciona, además, un método de determinación de la presencia de una enzima activa en una muestra, comprendiendo el método las etapas de:

- 45 a) poner en contacto al menos una porción de la muestra con un medio de captura, con lo que la enzima es capturada por dicho medio de captura;
- b) proporcionar un sustrato adecuado para la enzima capturada, reaccionando dicho sustrato con dicha enzima capturada para producir un producto enzimático;
- c) proporcionar una especie reactiva capaz de reaccionar con el producto enzimático, reaccionando dicha especie reactiva con dicho producto enzimático, produciendo un producto insoluble; y
- 50 d) detectar el producto insoluble obtenido en la etapa c), correlacionándose dicha detección con la presencia y/o la cantidad de una enzima activa en dicha muestra.

Preferentemente, la muestra es una muestra alimentaria o de pienso o una muestra de un componente alimentario o de pienso o una muestra de una composición de biocombustible o detergente. Preferentemente, la muestra es una muestra seca, rehidratada o acuosa. Lo más preferible es que la muestra sea una muestra líquida.

Preferentemente, la enzima activa detectada por el método es una fosfatasa o glucósido hidrolasa, siendo lo más preferible que se trate de una fosfatasa ácida, una fitasa, una xilanasas, una amilasa o una  $\beta$ -glucanasa.

5 Preferentemente, los medios de captura usados en el método son anticuerpos que se unen a la enzima activa que ha de ser detectada por el dispositivo (1) de ensayo. Los anticuerpos pueden ser suscitados contra la propia enzima o contra un componente de la misma (por ejemplo, un fragmento de la misma y/o un epítipo de la misma).

Preferentemente, el sustrato para la enzima capturada puede ser un sustrato de fosfatasa o un compuesto con un grupo donador de fosfato. Preferentemente, el sustrato es un sustrato de fosfatasa ácida y lo más preferible es que el sustrato de fosfatasa sea ácido 2-fosfo-L-ascórbico trisódico (AsAP).

10 Preferentemente, la especie reactiva usada en el método puede ser un compuesto de tetrazolio. Lo más preferible es que la especie reactiva pueda ser un compuesto de nitroazul de tetrazolio. La especie reactiva puede ser cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT). La especie reactiva puede ser, alternativamente, un compuesto de halonitrotetrazolio. La especie reactiva puede ser, preferentemente, un compuesto de yodonitrotetrazolio. Preferentemente, la especie reactiva es cloruro de yodonitrotetrazolio (INT).

15 El producto insoluble es, preferentemente, un precipitado, siendo lo más preferible que se trate de un precipitado visualmente detectable u observable, preferentemente un precipitado coloreado.

Preferentemente, el producto insoluble es detectado u observado visual o electrónicamente. Lo más preferible es que sea detectable debido a un cambio de color.

### Equipos de reactivos

20 La presente invención puede presentarse en forma de un equipo de reactivos. Tal equipo de reactivos permitirá al operario realizar el ensayo, preferentemente fuera del laboratorio. El equipo de reactivos puede proporcionar uno o más o la totalidad de los reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo. Tales reactivos pueden encontrarse en forma seca o deshidratada. Los reactivos secos pueden ser reconstituidos por la muestra en un disolvente, preferentemente una muestra acuosa. Preferentemente, todos los reactivos son secos, salvo el medio (50) de indicación selectiva o algún componente del medio (50) de indicación selectiva. Tal equipo de reactivos puede ser  
25 denominado "formato semiseco". Preferentemente, todos los reactivos son secos, salvo la especie reactiva. Lo más preferible es que todos los reactivos sean secos salvo una solución de tetrazolio, ya sea de INT o de NBT. El operario añade el líquido a los reactivos secos para llevar a cabo el ensayo.

30 Preferentemente, el dispositivo (1) de ensayo es suministrado en forma de un bastoncillo o, de forma sumamente preferente, de una tira. Lo más preferible es que los reactivos secos estén unidos a la tira o bastoncillo tal como sea proporcionada. Los equipos de reactivos de la presente invención también pueden comprender una o más bolsas (por ejemplo, bolsas de plástico), pipetas, jeringas, tubos o probetas. Preferentemente, la tira o bastoncillo está contenida en un soporte; por ejemplo, un soporte de plástico, cartulina o cartón.

El dispositivo de ensayo de la presente invención puede ser proporcionado en un equipo de reactivos, según se muestra en la realización 1 de la Figura 1 o la realización 2 de la Figura 1.

35 Un equipo de reactivos de la presente invención puede comprender o ser capaz de formar el dispositivo de ensayo y todos los componentes del dispositivo de ensayo, que incluyen:

- (a) una región (10) de colocación en la que puede colocarse la muestra;
- (b) una matriz (20) operativamente conectada a dicha región (10) de colocación, de modo que la muestra, cuando esté presente (tal como colocada) en dicha región (10) de colocación pueda migrar a lo largo de dicha matriz (20);
- 40 (c) al menos una ubicación diferenciada (30) de captura en dicha matriz (20), estando cada ubicación diferenciada (30) de captura alejada de la región (10) de colocación, y pudiendo migrar la muestra a través de dicha ubicación diferenciada (30) de captura;
- (d) medios (40) de captura que están presentes en cada ubicación diferenciada (30) de captura o que la definen, siendo dichos medios (40) de captura capaces de unirse con dicha enzima, de modo que al menos una porción de  
45 dicha muestra de dicha enzima quede retenida en al menos una ubicación diferenciada (30) de captura;
- (e) un medio (50) de indicación selectiva o al menos un componente del mismo para proporcionar una indicación selectiva de la presencia de la enzima activa unida a dichos medios de captura, comprendiendo el medio de indicación selectiva un reactivo o especie reactiva; y
- (f) un sustrato de dicha enzima, estando unido dicho sustrato al dispositivo (1) de ensayo.

50 Un equipo de reactivos de la presente invención puede comprender todos o sustancialmente todos los componentes del dispositivo de ensayo (a)-(d) y (f), proporcionándose los medios (50) de indicación selectiva, que son añadidos a continuación al dispositivo en uso.

Un equipo de reactivos de la presente invención puede comprender todos los componentes del dispositivo de ensayo (a)-(d) y (f) y al menos un componente de dicho medio de indicación selectiva y el equipo de reactivos comprende, además, el o los otros componentes del medio (50) de indicación selectiva, que son añadidos a continuación al dispositivo en uso.

5 Un equipo de reactivos de la presente invención puede comprender todos los componentes del dispositivo de ensayo (a)-(f).

10 Un disolvente tal como agua —u otra solución acuosa adecuada— puede estar incluido en un equipo de reactivos o dispositivo de la presente invención o ser añadido al mismo. Los mismos componentes del equipo de reactivos, o cualesquiera de ellos, pueden ser dispersados, disueltos o rehidratados en un disolvente, tal como agua, agua purificada o agua desionizada.

15 Un equipo de reactivos de la presente invención puede ser suministrado con una tarjeta de puntuación o tarjeta de referencia. La intensidad de un cambio de color puede ser evaluada usando una tarjeta de puntuación o tarjeta de referencia, preferentemente en la que el operario compara la intensidad de la reacción de color en la matriz (20) con la tarjeta de puntuación. Se puede llevar a cabo una medición semicuantitativa usando la tarjeta de puntuación, pudiendo determinarse, usando la tarjeta de puntuación, que la cantidad de enzima activa está, por ejemplo, por encima o por debajo de cierta cantidad o concentración —por ejemplo, por encima o por debajo de 300 FTU/g—.

20 La tarjeta de puntuación o tarjeta de referencia puede estar hecha de papel, cartulina u otros materiales físicos. Alternativamente, la tarjeta de puntuación o tarjeta de referencia puede ser visualizada electrónicamente; por ejemplo, en un teléfono, un teléfono inteligente, un ordenador u otro dispositivo informático. La tarjeta de puntuación puede ser comparada con una referencia electrónica y/o la tarjeta de puntuación puede ser leída electrónicamente.

### Ejemplos

La presente invención será descrita a título de ejemplo únicamente, haciéndose referencia a las siguientes Figuras.

La Parte 1 de la sección de Ejemplos proporciona detalles sobre dispositivos y métodos de ensayo de la presente invención para determinar la presencia de fitasa activa en una muestra.

25 La Parte 2 de la sección de Ejemplos proporciona detalles sobre metodología que puede ser usada para dispositivos y métodos de ensayo de la presente invención para determinar la presencia de xilanasas activas en una muestra.

Generación de anticuerpos para los dispositivos y los métodos de ensayo de la presente invención

30 Los anticuerpos para ser usados en el dispositivo y los métodos de ensayo de la presente invención pueden ser generados usando la metodología de Harboe N, Ingild A. Immunization, isolation of immunoglobulins, Estimation of antibody titre. Scand J Immunol Suppl. 1973, 1:161-4.

En la Parte 1 de la sección de Ejemplos, se generaron anticuerpos contra la fitasa BP17 para ser usados en el dispositivo y los métodos de ensayo de la presente invención, siguiendo la metodología de Harboe N (1973) (ibíd.). La secuencia de BP17 (excluyendo el péptido señal) ha sido mostrada anteriormente.

#### Parte 1

35 En el trabajo que condujo y dio lugar a la presente invención, se tomaron dos líneas diferentes de investigación.

Un planteamiento dio lugar a un dispositivo según la presente invención (representado genéricamente en la Figura 1) y a métodos que los usan y a equipos de reactivos que lo comprenden. Los inventores llamaron Formato 1 a este planteamiento. Este dispositivo, etc., es expuesto con detalle en el Ejemplo 1, etc.

40 Los inventores también trabajaron en un ensayo de flujo lateral de doble fase de anticuerpo conjugado con oro. Denominaron Formato 2 a este planteamiento. Por las razones explicadas en la presente memoria, se consideró que este planteamiento no era adecuado. La información relativa al Formato 2 (es decir, el ensayo de flujo lateral de doble fase de anticuerpo conjugado con oro), tal como la Figura 5 y su comentario asociado, ha sido añadida por razones comparativas (véase la sección del Ejemplo comparativo).

45 Además, en la sección del Ejemplo comparativo, los inventores efectuaron una comparación directa del Formato 1 con el Formato 2 para un aspecto de los experimentos.

Ejemplos 1 – 9

Formato 1 - Dispositivos y métodos de ensayo de la presente invención

Ejemplo 1

50 El ensayo y el dispositivo de la presente invención versan sobre un ensayo de captura de anticuerpo con sustrato de precipitación (por ejemplo, la Figura 1, la Figura 2 y la Figura 3).

En este sentido, se caracterizó el ensayo de captura de anticuerpo con sustrato de precipitación. Se identificó un ácido-sustrato de fosfatasa adecuado, cuya característica principal es la reducción de una sal de tetrazolio para producir un coloreado precipitado, y posteriormente se demostró que funcionaba en un ensayo de tipo flujo lateral con una respuesta de señal dependiente de la dosis.

5 Se observaron varios obstáculos en el desarrollo de un ensayo de captura de anticuerpo con sustrato de precipitación, tales como la complejidad del sustrato y la migración del precipitado generado debida al flujo de ensayo. Sin embargo, este ensayo fue más adecuado que el ensayo de doble fase de conjugado de oro (Figura 5), ya que mide directamente la actividad enzimática en lugar de simplemente depender de la unión de la enzima al anticuerpo.

10 El ensayo de captura de anticuerpo con sustrato de precipitación (Figura 2) fue extensamente desarrollado. Se investigaron múltiples formatos y el ensayo mejorado partiendo de un diseño inicialmente complejo con un sustrato de múltiples componentes y la manipulación del bastoncillo de ensayo tras la adición de la muestra hasta una configuración simple con etapas de usuario mínimas.

15 El aspecto semicuantitativo del ensayo está determinado por una región de ensayo de tres líneas, en la que un resultado de tres líneas representa altos niveles de enzima activa (un resultado positivo), dos líneas representan niveles intermedios (límite) y una o cero líneas indican niveles enzimáticos bajos (negativo).

La evolución de este ensayo dio lugar al desarrollo de un formato muy útil; concretamente, lo que los inventores llaman "formato semiseco". La Figura 3 muestra las etapas implicadas en el formato semiseco de la presente invención.

20 En este sentido, y según se ilustra en la Figura 3, el formato semiseco requiere que el operario produzca una muestra de ensayo en agua que es aplicada al bastoncillo de ensayo. Un componente del complejo de sustrato en solución es aplicado "directamente de la botella" (no se requiere preparación alguna por parte del operario) directamente a la matriz del bastoncillo de ensayo (nitrocelulosa en este caso) que es cubierta con una almohadilla que contiene los otros componentes del sustrato, que son secos. A continuación, se deja que el soporte de ensayo se revele y el resultado se lee después de 20-30 minutos (Figura 4). Aquí, la Figura 4 presenta resultados de una serie de disoluciones de 6-fitasa (denominada BP17) usando el formato semiseco de la Figura 3. La 6-fitasa deriva de *Buttiauxella* sp., como se ha descrito anteriormente.

25 También se investigó un "formato seco" en el que todos los componentes son secos en el soporte de ensayo para que el operario solo tuviera que aplicar la muestra (Figura 6). Aquí, el operario simplemente añade la muestra y revela el soporte de ensayo. Un soporte de ensayo final podría ser metido en un casete y no haría falta el contrapeso representado en la Figura 6. En el ejemplo ilustrado, ácido 2-fosfo-L-ascórbico trisódico (AsAP) donador de fosfato y metosulfato de fenacina (PMS) potenciador de la reacción son secados e introducidos en la matriz de nitrocelulosa (NC) del soporte de ensayo, y se coloca firmemente encima una almohadilla de nailon de sustrato de tetrazolio —cloruro de yodonitrotetrazolio (INT)—. La muestra líquida es añadida de la forma habitual, y la propia solución de muestra rehidrata los componentes del sustrato.

30 Así, en la Figura 6 (concretamente, un ejemplo de ensayo de formato seco) el operario simplemente añade la muestra y revela el soporte de ensayo. En esta Figura, ácido 2-fosfo-L-ascórbico trisódico = **AsAP**; metosulfato de fenacina potenciador de la reacción = **PMS**; matriz de nitrocelulosa = NC; y sustrato de tetrazolio, cloruro de yodonitrotetrazolio = INT.

#### Ejemplo 2 – Preparación de muestras

##### Disolvente

40 El método de preparación de muestras se llevó a cabo en el agua. Con fines de continuidad, se usó agua Milli-Q. Milli-Q se refiere a agua que ha sido purificada y desionizada se refiere a agua que ha sido purificada y desionizada hasta un grado elevado por un sistema de purificación de agua.

45 La Figura 7 muestra los resultados obtenidos cuando se extrajo 1 gramo de gránulos de pienso durante 30 minutos ya sea en 0,25 M de tampón acetato, pH 5,0, agua Milli-Q o agua de grifo y se realizó en el formato de flujo pasante por triplicado (véase también la Figura 11). En cada caso, la línea inferior representa la línea de ensayo y la línea superior es la línea de control. Los soportes de ensayo fueron fotografiados en los minutos 10 y 30 tras la aplicación del sustrato.

50 Los experimentos han demostrado que el uso de agua de grifo también produce resultados satisfactorios con el formato semiseco. El agua de grifo da una señal visual ligeramente mayor con respecto a los otros dos disolventes objeto de ensayo.

##### Tiempo de agitación

En el ejemplo ilustrado en la Figura 7, se extrajo 1 gramo de gránulos de pienso en 10 mL de agua Milli-Q y se dejó que la extracción prosiguiese durante 10 minutos con agitación constante. Sin embargo, experimentos adicionales han demostrado que la simple agitación de la extracción durante 5 minutos produce una total extracción de la fitasa BP17

en la fase acuosa (Figura 8). Así, la preparación de la muestra de ensayo es un procedimiento rápido y simple, realizable por un operario con mínima formación.

La Figura 8 muestra los resultados de un muestreo a diferentes intervalos de tiempo. Se añadió 1 gramo de gránulos de pienso a 10 mL de agua Milli-Q y la solución resultante fue muestreada a diversos intervalos temporales de cero a 60 minutos. Después de 5 minutos, la extracción parece ser suficiente para someterla a ensayo.

En un aspecto, el operario llenará un tubo o bolsa de extracción de muestras hasta un nivel predeterminado (marcado por una línea en el tubo) con gránulos de pienso y luego llenará el tubo hasta una segunda línea con agua de grifo. Las líneas serán marcadas para optimizar la proporción entre pienso y agua. Aunque se ha usado de principio a fin una proporción de 1:10, esta proporción podría ser alterada para variar la concentración enzimática efectiva si es preciso.

En los experimentos aquí presentados, se usó un puré de pienso virgen (carente de fitasa BP17) y fue extraído según antecede, y se añadió a este fitasa purificada BP17 para dar cantidades definidas de enzima.

### Ejemplo 3

Desarrollo del ensayo de captura de anticuerpo y sustrato de precipitación

#### El sustrato de precipitación

Para el ensayo de actividad se identificó un sustrato. Este sustrato es un sustrato genérico de fosfatasa ácida que usa un donador de fosfato (ácido 2-fosfo-L-ascórbico trisódico, **AsAP**), un potenciador de reacción (metosulfato de fenacina, **PMS**) y una especie reactiva (cloruro de nitroazul de tetrazolio, **NBT**). En presencia de estos compuestos químicos y de fosfatasa ácida, la sal soluble de tetrazolio será reducida, dando lugar a la producción de un precipitado insoluble (el derivado de formazano de la sal de tetrazolio). En el caso de nitroazul de tetrazolio, esto da lugar a la formación de un precipitado azul/morado.

Desarrollo del formato de ensayo

Durante la fase de viabilidad del proyecto se analizaron varios formatos.

#### *Formato de flujo pasante*

Este planteamiento utiliza la metodología de “flujo pasante”. A diferencia de la metodología estándar de flujo lateral, un ensayo de flujo pasante implica la aplicación de la muestra directamente encima de una nitrocelulosa especializada (dispuesta en rayas con anticuerpos anti-fitasa BP17) y la muestra es extraída a través de la nitrocelulosa por medio de una almohadilla absorbente subyacente. Tras la aplicación de la muestra, el sustrato es aplicado de la misma manera y se permite que el soporte de ensayo se revele (Figura 11).

La Figura 11 es una representación esquemática del formato de flujo pasante. El formato de la Figura 11 es muy simple y da un resultado visual claro. Sin embargo, para algunos aspectos, puede ser deseable contar con un formato semicuantitativo aún mejor. Así, para facilitar la interpretación de los resultados por parte del operario de esta manera, los inventores decidieron producir formatos de ensayo de múltiples líneas en los que el número de líneas de ensayo visibles después de la finalización del ensayo indicarían los niveles de enzima presentes en la muestra.

#### *Formato de tira reactiva*

Este formato adopta el planteamiento de líneas múltiples. Inicialmente, la nitrocelulosa fue dispuesta en rayas con 6 líneas de concentraciones crecientes, y todo el bastoncillo de ensayo fue sumergido (hundido) en la muestra de extracto de pienso. Tras su incubación, el bastoncillo es aclarado en agua y luego se aplica la solución de sustrato y se deja que se revele el soporte de ensayo (Figura 12).

La Figura 12 muestra una representación esquemática del formato de tira reactiva. Este formato fue muy fácil de realizar, y una ventaja fue que no había presente ninguna almohadilla absorbente en el bastoncillo de ensayo, lo que significaba que no era precisa ninguna manipulación del bastoncillo de ensayo tras la muestra. El ensayo funcionó, pero hay casos en que se desea un resultado semicuantitativo aún mejor. Aquí todas las líneas del ensayo fueron visibles cuando estaba presente la enzima objeto de ensayo —fitasa BP17—, aunque con intensidades visuales dependientes de la dosis. Idealmente, las líneas de ensayo con concentraciones menores anti-fitasa BP17 no habrían aparecido cuando se expusieran a muestras de bajo nivel de fitasa BP17, pero no fue así (Figura 13).

La Figura 13 muestra los resultados de ensayo del formato de tira reactiva. Aquí, la nitrocelulosa fue dispuesta en rayas con 6 líneas de ensayo a 4, 2, 1, 0,5, 0,25 y 0,125 mg/mL de anti-fitasa BP17 (de derecha a izquierda en la fotografía). Se añadieron bastoncillos de ensayo directamente a los tubos de extracción de pienso (7 mL, con 0-1,0 U/mL fitasa BP17) y se incubaron durante 20 minutos con agitación. A continuación, los bastoncillos fueron retirados, aclarados brevemente en agua Milli-Q y se añadió sustrato a los bastoncillos. Se dejó que los soportes de ensayo se revelaran durante 30 minutos y luego fueron fotografiados. No parece que el resultado sea semicuantitativo, y parece que también se veía mucho fondo, que era proporcional a la cantidad de fitasa BP17 en la muestra.

*Formato de tira reactiva absorbente*

Aquí se usó un bastoncillo de ensayo similar a la tira reactiva, pero con el ensayo ejecutado de manera diferente. En vez de sumergir todo el bastoncillo de ensayo, aquí se dejó que la muestra migrara a lo largo del bastoncillo de ensayo por acción capilar. Una vez completo, se aplicó el sustrato de manera similar y se dejó que prosiguiera el revelado de las líneas (Figura 14).

La Figura 14 presenta una representación esquemática del formato de tira reactiva absorbente. Este formato de ensayo fue ejecutado verticalmente con la muestra en un pocillo de placa de microtitulación y, una vez que la muestra hubo discurrido, el bastoncillo fue retirado del pocillo y puesto horizontalmente para permitir la adición del sustrato.

Inicialmente se empleó un soporte de ensayo de múltiples líneas con cantidades variables de anti-fitasa BP17 y se demostró que el orden en el que la muestra encontraba las líneas era importante para el revelado del soporte de ensayo. Parecía que la fitasa BP17 en la muestra se uniría a la primera línea de ensayo, y que si seguía habiendo fitasa BP17 no unida esta proseguiría a la segunda línea, etcétera. Así, si la primera línea de ensayo contenía un nivel elevado de anticuerpos anti-fitasa BP17, entonces la mayoría de la muestra podría unirse a esa línea, dejando poco restante para unirse a las líneas subsiguientes. Por otro lado, si la primera línea encontrada contenía niveles bajos de anticuerpos, entonces esta línea podría saturarse rápidamente y la mayoría de la fitasa BP17 seguiría a la siguiente línea de ensayo (Figura 15). Esto muestra que el nivel más bajo de anticuerpos estaría preferentemente en proximidad máxima a la región de colocación.

La Figura 15 muestra los resultados de ensayo del formato de tira reactiva absorbente. Aquí, se rayó nitrocelulosa con líneas de ensayo a 4, 1 y 0,25 mg/mL de anti-fitasa BP17. Las muestras fueron diluidas en agua a 0,2, 0,05, 0,012, 0,006 U/mL de fitasa BP17. Las muestras subieron por la NC tocando el extremo de la solución y dejando que la solución ascendiera por el bastoncillo por acción capilar. Se comprobaron dos orientaciones del bastoncillo: De 4 to 0,25 mg/mL, y de 0,25 a 4 mg/mL. Después de 10 minutos, los bastoncillos fueron expuestos a la solución de sustrato y se dejó que se revelaran durante 30 minutos. La orientación de las concentraciones de la línea de ensayo tiene un impacto significativo en la ejecución del ensayo con éxito.

Para simplificar el sistema de ensayo, experimentos con múltiples líneas con una única concentración de anti-fitasa BP17 fueron sometidos a ensayo. Inicialmente, pareció que la gran mayoría de la fitasa BP17 en la muestra se estaba uniendo a la primera línea de ensayo. Sin embargo, este problema percibido fue evitado por la adición de reactivos de bloqueo a la muestra, mostrando la proteína caseína de la leche los mejores resultados (Figura 16).

La Figura 16 muestra los resultados de ensayo del formato de tira reactiva absorbente usando diferentes agentes de bloqueo. Se prepararon muestras a 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 U/mL de fitasa BP17 y controles nulos en extractos de puré virgen (ya fuera de agua o caseína). Se colocaron bastoncillos de ensayo en pocillos de placas de microtitulación que contenían muestras de 40  $\mu$ L y se dejó que la muestra subiera por el bastoncillo durante 10 minutos. Los bastoncillos se secaron con papel secante, fueron colocados de forma plana y se pipetearon 40  $\mu$ L de solución de sustrato sobre la nitrocelulosa. Se dejó que los bastoncillos se revelaran durante 30 minutos y luego fueron fotografiados (véase el Ejemplo 6).

La Figura 17 muestra resultados relativos a la variación de la concentración de las líneas de ensayo para modular la naturaleza semicuantitativa del ensayo (formato de tira reactiva absorbente). Los resultados muestran que la concentración del anticuerpo de la línea de ensayo influye en la naturaleza semicuantitativa del ensayo, pareciendo que una concentración de 0,4-0,6 mg/mL es óptima para la especificación requerida y que demuestra así que la muestra es capaz de atravesar los medios de captura.

Con mayor detalle, la Figura 17 muestra los resultados de la variación de la concentración de las líneas de ensayo para modular la naturaleza semicuantitativa del ensayo usando el formato de tira reactiva absorbente. Se rayó nitrocelulosa con tres líneas de ensayo de la misma concentración, ya fuera 0,4, 0,6, 0,8 o 1,0 mg/mL de anti-fitasa BP17. Se preparó un extracto de puré virgen con 1 g de puré en 10 mL de una solución de caseína a 50 mg/mL incubada durante 10 minutos en la mezcladora de rodillos. Se añadió fitasa BP17 pura al extracto de puré a 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125, 0,00625 y 0,003125 U/mL. Se pipetearon muestras de 40  $\mu$ L en pocillos de una placa de microtitulación, se insertaron bastoncillos y se dejó que la muestra migrara ascendientemente por el bastoncillo por acción capilar durante 10 minutos. Los bastoncillos fueron retirados, secados en papel secante, y 40  $\mu$ L de solución de sustrato fueron pipeteados sobre los bastoncillos y se dejó que se revelaran durante 30 minutos. La concentración del anticuerpo de la línea de ensayo influye en la naturaleza semicuantitativa del ensayo, pareciendo que una concentración de 0,4-0,6 mg/mL es óptima para la especificación requerida. Estos resultados muestran que, con un bloqueo adecuado, podría usarse la variación de la concentración de la línea de ensayo para modular la naturaleza semicuantitativa del ensayo.

Como con el formato de la tira reactiva, la ventaja del formato de tira reactiva absorbente era que no había presente ninguna almohadilla absorbente en el bastoncillo de ensayo y que, así, el operario no tendría que manipular el bastoncillo de ensayo con adiciones posteriores a la muestra y anteriores al sustrato. Sin embargo, un formato vertical puede no ser muy deseable para algunos usos, especialmente si el bastoncillo tuviera que ser reorientado antes de la adición de sustrato.

Para abordar esto, se desarrolló un formato horizontal con materiales muy similares, siendo la única adición una almohadilla absorbente de muestras aguas arriba de la porción de nitrocelulosa del bastoncillo de ensayo. Este planteamiento dio un resultado de alta calidad y abrió la posibilidad de un desarrollo ulterior que no habría sido posible con el Formato 2. En algunos casos, puede requerirse la adición de bloqueadores. En algunos casos, puede ser preciso retirar la almohadilla de muestras antes de la adición del sustrato.

#### Ejemplo 4 - Sustratos de tetrazolio

En este ejemplo, se sometió a ensayo un sustrato de tetrazolio: cloruro de yodonitrotetrazolio (INT). Este sustrato dio lugar a un precipitado rojo sobre la línea de ensayo (en vez del azul/morado con NBT).

La Figura 18 muestra una comparación entre NBT e INT con el ensayo de la tira reactiva absorbente. Se preparó extracto de puré virgen con 1 g de puré en 10 mL de una solución de caseína a 50 mg/mL incubada durante 10 minutos en la mezcladora de rodillos. Se añadió fitasa BP17 pura al extracto de puré a 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 y 0,00625 U/mL. Se pipetearon muestras de 40 µL en pocillos de una placa de microtitulación, se insertaron bastoncillos y se dejó que la muestra migrara ascendentemente por el bastoncillo por acción capilar durante 10 minutos. La solución de INT fue creada a 4,45 mg/mL en tampón acetato; esto da la misma molaridad que la solución de NBT. Los bastoncillos fueron retirados, secados en papel secante, y 40 µL de solución de sustrato fueron pipeteados sobre los bastoncillos, incubados durante 1 minuto. La solución de sustrato fue entonces eliminada, los bastoncillos fueron secados en papel secante y se dejó que se revelaran durante 30 minutos.

Según puede verse por la Figura 18, los resultados mostraron que el uso de INT como sustrato dio resultados similares a los de NBT. De este punto en adelante se usaron tanto NBT como INT de manera intercambiable.

#### Ejemplo 5 - Tipos de nitrocelulosa

Dado que se consideró que el formato horizontal era un formato prometedor, se llevó a cabo un experimento que sometió a ensayo a una amplia gama de tipos de nitrocelulosa para determinar el más apropiado para este formato (Figura 19).

La Figura 19 presenta los resultados del sometimiento a ensayo de una amplia gama de tipos de nitrocelulosa para determinar el más apropiado. Se dispusieron en rayas diversos tipos de nitrocelulosa con tres líneas de ensayo a 0,5 mg/mL de anti-fitasa BP17. Las muestras de fitasa BP17 fueron diluidas a partir de la enzima purificada en un extracto de puré de pienso virgen (1 g en 10 mL de agua), dando 0,2 y 0,04 U/mL de fitasa BP17 (más un control de pienso solo de cero). Se pipetearon extractos sobre las almohadillas de muestra de los bastoncillos de ensayo y se dejó que la muestra migrara a lo largo del bastoncillo por acción capilar hasta la finalización. Las almohadillas de muestra se retiraron y se aplicaron 40 µL de sustrato. Se dejó que el ensayo prosiguiera hasta 20 minutos y luego se fotografió.

Una de las membranas de nitrocelulosa objeto de ensayo, concretamente la MDI 90 CNPH, presentó los mejores resultados (véase la Figura 19) y, ciertamente, había sido la nitrocelulosa elegida según lo determinado por experimentos previos con formatos anteriores. Esta nitrocelulosa está fácilmente disponible. Otros dos tipos de nitrocelulosa (MDI SS12 12µ y SS12 15µ) también dieron resultados satisfactorios. Todas las membranas objeto de ensayo dieron una respuesta.

#### Ejemplo 6 - Reactivos de bloqueo

Hasta este punto, el reactivo de bloqueo (por ejemplo, caseína) había sido añadido a la muestra después de la extracción. Se decidió que esto no era ideal, ya que requeriría que la solución fuera suministrada con el ensayo final y requeriría que el operario la añadiera al extracto de pienso. Se llevaron a cabo experimentos para abordar esto. La caseína puede ser difícil de disolver en agua. Sin embargo, se descubrió que una sal sódica de caseína era mejor en este sentido. Esto permitió la posibilidad de añadir caseína sódica en cantidades definidas directamente a la extracción de pienso. Este planteamiento era funcional. Sin embargo, para algunos aspectos, este planteamiento podría ser optimizado aún más, dado que requeriría suministrar cantidades definidas de caseína sódica en el tubo de extracción de la muestra que podrían ser desplazadas durante el envío y perderse al abrir el tubo. Por ende, se decidió comprobar la posibilidad de suministrar el reactivo de bloqueo dentro del propio bastoncillo de ensayo.

Se diseñaron experimentos para colocar el reactivo de bloqueo seco en una almohadilla entre la almohadilla de muestra y la nitrocelulosa del soporte de ensayo.

La Figura 20 muestra los resultados de someter a ensayo la reducción de la concentración del agente de bloqueo en presencia de un tensioactivo (Tween-20). Almohadillas de conjugado de poliéster fueron saturadas con soluciones de caseína a diversas concentraciones y fueron secadas a 37°C. A continuación, se colocaron almohadillas "aguas arriba" de los bastoncillos de ensayo (junto con una almohadilla adicional de muestra). Se extrajo un puré virgen en agua (1 g en 10 mL) y se diluyó en los extractos enzima purificada. Se pipetearon las muestras en la almohadilla de muestra, las cuales fluyeron entonces a través de las almohadillas que contenían caseína y a los bastoncillos de ensayo. Las almohadillas de muestra y conjugado fueron retiradas y se aplicaron 40 µL de sustrato. Se dejó que los ensayos prosiguieran hasta 20 minutos y luego se fotografiaron. Se vio un resultado sorprendente, porque la presencia del



tensioactivo por sí solo fue suficiente para dejar que el ensayo tuviese un desempeño satisfactorio. Así, la almohadilla sin caseína mostró la misma intensidad de color que las almohadillas con caseína.

5 Alentados por este hallazgo, los inventores diseñaron experimentos para añadir los reactivos de bloqueo directamente en la nitrocelulosa del soporte de ensayo para determinar si este planteamiento también daría un resultado satisfactorio.

La Figura 21 muestra los resultados obtenidos añadiendo los reactivos de bloqueo directamente en la nitrocelulosa del soporte de ensayo para comprobar si podrían obtenerse resultados satisfactorios.

10 Con mayor detalle, la Figura 21 ilustra los resultados de un experimento para añadir los reactivos de bloqueo directamente a la nitrocelulosa. Se incubaron trozos de nitrocelulosa en diversas soluciones de caseína/Tween durante 5 minutos y luego fueron secados a 55°C durante 10 minutos. La nitrocelulosa fue laminada en una cartulina de soporte con una almohadilla de muestra no tratada (y ninguna almohadilla de conjugado). También se construyó un conjunto de bastoncillos de control con NC no bloqueada y una almohadilla de conjugado de caseína/Tween. Se diluyeron muestras de fitasa BP17 a partir de enzima purificada en un extracto de puré virgen (1 g en 10 mL de agua), dando 15 0,2 y 0,04 U/mL de fitasa BP17 (más un control de pienso solo de cero). Se pipetearon extractos sobre las almohadillas de muestra de los bastoncillos de ensayo y se dejó que la muestra migrara a lo largo del bastoncillo por acción capilar hasta la finalización. Las almohadillas de muestra y conjugado se retiraron y se aplicaron 40 µL de sustrato. Se dejó que los ensayos prosiguieran hasta 20 minutos y luego se fotografiaron.

De nuevo, una situación en la que el tensioactivo estaba solo, en ausencia de caseína, dio excelentes resultados (Figura 21).

20 Se sometió a ensayo a una serie de disoluciones de concentraciones de fitasa BP17 con NC bloqueada solo por tensioactivo con sustratos tanto de INT como de NBT para comprobar la sensibilidad de este método.

25 La Figura 22 muestra los resultados de una serie de disoluciones de concentraciones de fitasa BP17 objeto de ensayo con NC bloqueada solo por tensioactivo con sustratos tanto de INT como de NBT para comprobar la sensibilidad de este método. La nitrocelulosa dispuesta en rayas fue incubada en soluciones de Tween-20 al 0,25% durante 5 minutos y luego secada a 55°C durante 10 minutos. Se diluyeron muestras de fitasa BP17 a partir de enzima purificada en un extracto de puré virgen (1 g en 10 mL de agua), dando una serie de disoluciones de 0,4-0,0015 U/mL de fitasa BP17 (más un control de pienso solo de cero).

30 Con mayor detalle, la Figura 22 muestra los resultados de este experimento. Se incubó nitrocelulosa dispuesta en rayas en soluciones de Tween-20 al 0,25% durante 5 minutos y luego fue secada a 55°C durante 10 minutos. Se diluyeron muestras de fitasa BP17 a partir de enzima purificada en un extracto de puré virgen (1 g en 10 mL de agua), dando una serie de disoluciones de 0,4-0,0015 U/mL de fitasa BP17 (más un control de pienso solo de cero). Se pipetearon extractos en las almohadillas de muestra de los bastoncillos de ensayo, y se dejó que la muestra migrara a lo largo del bastoncillo por acción capilar hasta la finalización. Las almohadillas de muestra y conjugado se retiraron y se aplicaron 40 µL de sustrato (a base de NBT o INT). Se dejó que los ensayos prosiguieran hasta 20 minutos y 35 luego se fotografiaron. Los resultados muestran que ambos sustratos tuvieron un desempeño similar y la sensibilidad general y la naturaleza semicuantitativa del método parecieron excelentes.

40 El atractivo de un método de bloqueo directo de la nitrocelulosa con tensioactivo es que elimina la necesidad de incluir una almohadilla secundaria de bloque en el bastoncillo de ensayo y, así, elimina un nivel de complejidad con respecto al conjunto de ensayo. Además, la inclusión del reactivo de bloqueo en el propio soporte de ensayo niega el requerimiento de que el operario haga nada distinto de añadir pienso y agua a un tubo vacío para la preparación de la muestra.

45 El bastoncillo de ensayo producido es un diseño muy simple, comprendiendo nitrocelulosa del soporte de ensayo dispuesta en rayas con tres líneas de anticuerpos anti-fitasa BP17, todas a la misma concentración y bloqueadas, tras la disposición en rayas, con una solución de Tween-20 al 0,1% en agua, unido a una almohadilla de muestra no tratada virgen.

#### Ejemplo 7 - Experimentos de administración de sustrato

50 En todos los experimentos detallados en lo que antecede, la solución de sustrato fue añadida mezclando entre sí los tres componentes (AsAP, PMS y tetrazolio, INT o NBT) inmediatamente antes de su uso. Para simplificar esto para el operario, se llevaron a cabo experimentos para intentar secar estos componentes para el formato final de ensayo. Esto significaría que el operario no sería responsable de la composición del sustrato y negaría el requerimiento de suministrar componentes líquidos de ensayo.

Se realizaron experimentos iniciales en los que los diversos componentes del sustrato fueron mezclados entre sí y usados para saturar almohadillas absorbentes, seguido por su secado y almacenamiento a 37°C, y los resultados son mostrados en la Figura 23.

La Figura 23 muestra los resultados obtenidos cuando se sometió a ensayo el secado y el almacenamiento de los diversos componentes del sustrato mezclados entre sí. Se empaparon cuadrados de absorbente de 1cm en diversas combinaciones de los sustratos (premezclados) durante 5 minutos. Las almohadillas fueron secadas en papel secante y colocadas en una incubadora a 37°C. Se consideró que a los 30 minutos las almohadillas estaban secas y se consideró que este era el “Instante=0”. Las almohadillas fueron monitorizadas a intervalos temporales regulares, buscando específicamente cambios de color de polarización morada (NBT) o polarización roja (INT). Se muestran el instante cero y de un día para otro.

En este experimento, se empaparon cuadrados de absorbente de 1cm en diversas combinaciones de los sustratos (premezclados) durante 5 minutos. Las almohadillas fueron secadas en papel secante y colocadas en una incubadora a 37°C. Se consideró que a los 30 minutos las almohadillas estaban secas y se consideró que este era el “Instante=0”. Las almohadillas fueron monitorizadas a intervalos temporales regulares, buscando específicamente cambios de color de polarización morada (NBT) o polarización roja (INT). En la Figura 23 se muestran el instante cero y de un día para otro. Después de la noche, parece que las combinaciones más utilizables son: NBT o INT por sí solo; AsAP + PMS; PMS; AsAP + INT parece moderadamente estable, y más estable que AsAP + NBT.

A partir de este experimento estaba claro que la mezcla de la solución de tetrazolio —tanto INT como NBT— con cualquiera de los demás componentes del ensayo daba lugar a la precipitación final del tetrazolio con el tiempo.

También se demostró que la mezcla y el secado del AsAP y del PMS parecían estables en el tiempo. Se realizaron experimentos para utilizar todos estos componentes secos, así como experimentos en los que algunos de los componentes del sustrato están secos, mientras que otros son usados en disolución. Parece posible que todos los componentes del ensayo pudieran ser proporcionados en forma seca. Potencialmente, el uso de una muestra acuosa podría rehidratar los componentes secos.

Así, en la Figura 6 (un ejemplo de un ensayo de formato seco), el usuario (operario) simplemente añade la muestra y revela el soporte de ensayo. En esta Figura, ácido 2-fosfo-L-ascórbico trisódico = AsAP; metosulfato de fenacina potenciador de la reacción = PMS; matriz de nitrocelulosa = NC; y sustrato de tetrazolio, cloruro de yodonitrotetrazolio = INT.

#### Ejemplo 8 - El formato seco

Se realizaron experimentos para secar todos los componentes de ensayo en el ensayo para que el operario simplemente tenga que añadir un extracto al soporte de ensayo y luego leer el resultado, sin ninguna adición ni manipulaciones adicionales. Aquí, se incorporarían almohadillas, con todos los componentes secos, en diversas partes del sistema de ensayo. Según se mostró anteriormente, los tres componentes no pueden ser mezclados de antemano y secados en una sola almohadilla y, por ello, debería determinarse un sistema de ensayo en el que los diversos componentes puedan separarse, o al menos utilizar combinaciones que sean estables, así como sus diversas ubicaciones dentro del soporte de ensayo. En la Figura 6 puede verse un ejemplo de cómo se contempla tal ensayo. Así, la Figura 6 presenta un diagrama de un ensayo de formato seco.

En el ensayo de formato seco de la Figura 6, el operario simplemente añade la muestra y revela el soporte de ensayo. Un ensayo final podría ser metido en un casete y no haría falta el contrapeso representado en la Figura 6. En el ejemplo ilustrado, se seca PMS/AsAP en la nitrocelulosa del soporte de ensayo, y se coloca firmemente encima una almohadilla de nailon de INT. La muestra líquida es añadida de la forma habitual, y la propia solución de muestra rehidrata los componentes del sustrato.

#### Ejemplo 9 – El formato semiseco

Como alternativa al formato seco (anterior), se realizaron experimentos en los que algunos de los componentes fueron suministrados en forma seca y otros permanecieron en disolución. Esto produjo un sistema de ensayo denominado formato semiseco.

En el formato semiseco, la muestra discurre a lo largo del bastoncillo horizontal como antes y, una vez completa, la solución de tetrazolio es pipeteada directamente sobre la nitrocelulosa del soporte de ensayo. Esta es entonces cubierta con una almohadilla de nitrocelulosa que contiene AsAP/PMS seco y se deja que el soporte de ensayo se revele. Esto se ilustra en la Figura 3 (etapas implicadas en el formato semiseco).

Este formato tiene varias ventajas. El operario no tiene que preparar los reactivos del sustrato antes del ensayo, y aunque el formato requiere que se proporciona la solución de tetrazolio, se trata simplemente de añadirla “directamente de la botella”. Una ventaja observada con este formato es que se elimina el requerimiento de retirar la almohadilla absorbente. Parece que la presencia de la almohadilla de AsAP/PMS fija el precipitado en su sitio y el precipitado resultante no migra ni siquiera en presencia de la almohadilla de muestra.

En la Figura 24 se muestra una comparación entre el formato semiseco y el anterior formato (todo en solución).

La Figura 24 muestra una comparación entre el formato semiseco y el formato de todo en solución. Se diluyeron muestras de fitasa BP17 a partir de enzima purificada en un extracto de puré virgen (1 g en 10 mL de agua), dando

una serie de disoluciones de 0,4-0,0015 U/mL de fitasa BP17 (más un control de pienso solo de cero). Se pipetearon extractos en las almohadillas de muestra de los bastoncillos de ensayo, y se dejó que la muestra migrara a lo largo del bastoncillo por acción capilar hasta la finalización. Para el formato de todo en solución, se retiraron las almohadillas de muestra y se aplicaron 40 µL de sustrato completo. Para el formato semiseco, se añadieron 20 µL de solución de INT a la nitrocelulosa del soporte de ensayo y se colocó una almohadilla de PMS/AsAP encima. Se dejó que los ensayos prosiguieran hasta 20 minutos y luego se fotografiaron.

Los resultados del experimento de la Figura 24 muestran que la sensibilidad del método semiseco es aceptable con respecto a las especificaciones del ensayo.

Para que este formato semiseco sea aceptable, es importante que la solución de tetrazolio permanezca estable durante la vida útil propuesta del ensayo final. Se iniciaron experimentos para abordar esto. En la Figura 25 se muestran los resultados de tal experimento.

En el experimento de la Figura 25, se diluyeron muestras de fitasa BP17 a partir de enzima purificada en un extracto de puré virgen (1 g en 10 mL de agua), dando 0,2 y 0,04 U/mL de BP17. Se preparó INT a 40 mg/mL en metanol al 50%, 0,125M de tampón acetato calentado a 60°C para disolverlo. Esta solución madre fue diluida hasta 10 mg/mL en 0,25M de tampón acetato. Se almacenaron partes alícuotas congeladas a -20°C, a temperatura ambiente y a 55°C. Se pipetearon 40 µL de cada uno de los extractos sobre las almohadillas de muestra de los bastoncillos de ensayo y se dejó que la muestra migrara a lo largo del bastoncillo por acción capilar hasta la finalización. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se pipetearon 20 µL de la solución de INT sobre la NC del soporte de ensayo y se colocó encima una tira de NC PMS/AsAP. Se dejó que el ensayo prosiguiera hasta 20 minutos y se fotografía. Se llevó a cabo un ensayo de "instante = cero" inmediatamente con una solución de INT recién preparada para dar una señal de referencia. Después de 14 días, se compararon visualmente las soluciones congelada, a TA y a 55°C para dar una comparación continua de la estabilidad de las soluciones de INT. Después de 14 días, no se vio ningún deterioro de la solución de INT a TA o 55°C. Con los ensayos de -20°C, la señal fue menor que a las otras temperaturas, lo que se cree que es debido a cierta precipitación de INT durante el almacenamiento y la descongelación.

Dado que, tras 2 semanas, a todas las temperaturas, no se observó diferencia alguna en actividad, esto sugiere que la solución de tetrazolio tiene buena estabilidad en el tiempo (Figura 25).

#### Ejemplo 10 - Equipo de reactivos

La Figura 29 ilustra el uso de un dispositivo/equipo de reactivos/ensayo de la invención.

En el panel 1 de la Figura 29, una bolsa de recogida es llenada con la muestra hasta la primera línea indicada, luego la bolsa es llenada con agua hasta la segunda línea indicada.

En el panel 2, la bolsa es sellada y luego agitada hasta que la muestra se descompone.

En el panel 3, el soporte (según la realización 1, ilustrada en la Figura 1) es abierto como un libro.

En el panel 4, se llena una pipeta con parte del extracto de muestra de la bolsa, y esa parte es aplicada a la región de colocación en el soporte.

En el panel 5, el usuario aguarda hasta que el líquido haya migrado a la parte superior del bastoncillo. Esto puede ser indicado por un cambio de color.

En el panel 6, se añaden al dispositivo uno o más componentes del medio de indicación selectiva.

En el panel 7, el soporte es cerrado y sellado.

En el panel 8, el soporte es puesto en una superficie plana para su revelado.

En el panel 9, se muestran resultados en una, dos y tres líneas.

#### Ejemplo comparativo

##### Formato 2 - Ensayo de fase doble de anticuerpo conjugado con oro

El ensayo de fase doble de anticuerpo conjugado con oro ilustrado en la Figura 5 discriminaba entre muestras de pienso que contenían una actividad de fitasa BP17 de alto y bajo nivel. La intensidad de las señales generadas en este ensayo podía ser atenuada por la inclusión de anticuerpos libres anti-fitasa BP17, cuyas concentraciones se demostró que eran capaces de desplazar la respuesta lineal del ensayo al intervalo de actividad deseado de la fitasa BP17.

Sin embargo, con esta metodología, los sueros policlonales de conejo antifitasa BP17 empleados reaccionan tanto con la enzima nativa como con la desnaturalizada.

Además, con el trabajo de ensayo de fase doble con oro había la sospecha de que, en realidad, la muestra inactiva se estaba mermando de enzima y el procedimiento de inactivación había destruido la enzima más que lograr una simple inactivación.

5 Para abordar esto, se llevaron a cabo SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia de las muestras y esto demostró que esta teoría era correcta y que las muestras inactivas estaban, ciertamente, mermadas de la enzima (Figura 9).

10 La Figura 9 versa sobre SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia de las muestras de pienso y fitasa purificada BP17. Los resultados demostraron que los gránulos de la "Prueba 5" tenían muy poca fitasa BP17 detectable en comparación con el puré, y que la fitasa BP17 inactiva no tenía ninguna banda discernible de fitasa BP17 (aunque se veía una mancha general de material en la inmunoelectrotransferencia). La fitasa purificada BP17 y la fitasa BP17 activa (líneas 9 y 10) daban una banda intensa en la tinción proteínica, pero una multitud de bandas en la inmunoelectrotransferencia, probablemente debido a los niveles de fondo de multímeros y productos de descomposición de la fitasa BP17, nada de lo cual se halló en la muestra inactivada por calor (línea 8).

15 Con algo más de detalle, la Figura 9 muestra los resultados de SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia de muestras de pienso y fitasa purificada BP17. Muestras de fitasa BP17 activa e inactiva fueron concentradas 30 veces usando microconcentradores. Se había demostrado que los gránulos y el puré de la "Prueba 5" que fueron usados así tenía un alto nivel de fitasa BP17 en el puré y cantidades insignificantes en los gránulos procesados. Los gránulos y el puré fueron extraídos en agua Milli-Q durante 10 minutos y las extracciones resultantes se realizaron en SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y tincionadas para proteína total con Ponceau S (panel de la izquierda), hibridadas por membrana con anticuerpo primario antisérico anti-fitasa BP17, seguido por anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti conejo y fueron visualizadas con conjugado de estreptavidina-Qdot 625 (Invitrogen). Los resultados mostraron que los gránulos de la Prueba 5 tenían muy poca fitasa BP17 detectable en comparación con el puré, y que la fitasa BP17 inactiva no tenía ninguna banda discernible de fitasa BP17 (aunque se veía una mancha general de material en la inmunoelectrotransferencia). La fitasa purificada BP17 y la fitasa BP17 activa daban una banda intensa en la tinción proteínica, pero una multitud de bandas en la inmunoelectrotransferencia, probablemente debido a los niveles de fondo de multímeros y productos de descomposición de la fitasa BP17, nada de lo cual se halló en la muestra inactiva.

20 Este hallazgo ponía en duda la validez del ensayo con oro para determinar los niveles de enzima activa en una muestra dada. Aunque parece probable que la fitasa BP17 inactivada experimentalmente y el pienso con baja actividad de la fitasa BP17 con posterioridad al procesamiento serían comparables desde el punto de vista mecánico (es decir, destruyéndose la fitasa BP17 en ambos casos), el ensayo a base de oro no sería capaz de detectar una situación en la que la inactivación de la fitasa BP17 hubiera ocurrido a través de la desnaturalización y no de la destrucción.

25 Para verificar esto, se usó el hexasulfato de mioinositol (MIHS) inhibidor específico de la fitasa BP17 para inhibir la actividad de la fitasa BP17 sin destruir la enzima. Aquí, el ensayo con oro siguió siendo capaz de detectar la presencia de la enzima inhibida, mientras que el ensayo de actividad mostró una señal muy reducida (Figura 10).

30 La Figura 10 muestra una comparación del formato de fase doble con oro (Formato 2) y el formato de actividad enzimática con sustrato de precipitación (Formato 1; es decir, el ensayo de la presente invención) usando el inhibidor MIHS específico a la fitasa BP17.

35 En la Figura 10, en la parte superior se presentan los resultados para el ensayo de fase doble con oro. Aquí, se preparó fitasa purificada BP17 en 75 mM de tampón glicina-HCl, pH 2,5 a diversas concentraciones con o sin 2,5 mM de MIHS y se dejó incubando durante 20 minutos antes de someterla a ensayo. El ensayo con oro se efectuó con muestras de 100  $\mu$ L.

40 A modo de comparación, en la Figura 10, en la parte inferior, también se presentan ensayos del sustrato de precipitación. Los ensayos del sustrato de precipitación se efectuaron con muestras de 40  $\mu$ L a diversas concentraciones. Se aplicaron 40  $\mu$ L de 2,5 mM de MIHS en 75 mM de tampón glicina (o control solo de tampón) a los bastoncillos de ensayo y se incubaron durante 15 minutos. A continuación, se retiró la solución y se añadió la solución de sustrato (AsAP, PMS, cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) en Tween-20 al 2%). Esto se incubó durante 1 minuto, se retiró y se dejó que los bastoncillos se revelaran. El soporte de ensayo fue fotografiado después de 20 minutos. Los resultados sugieren que el ensayo con oro detecta la fitasa BP17, esté o no inhibida, mientras que el ensayo con sustrato de precipitación detecta claramente únicamente la enzima activa.

45 Por la Figura 10, que es una comparación entre el formato de fase doble con oro y el formato de actividad enzimática con sustrato de precipitación usando el inhibidor MIHS específico a la fitasa BP17 (que inhibe la actividad de la fitasa BP17 sin destruir la enzima), puede verse que el ensayo con oro (parte superior) seguía siendo capaz de detectar la presencia de la enzima inhibida, mientras que el ensayo de actividad (parte inferior) mostró una señal muy reducida.

50 Así, el formato de fase doble de anticuerpo conjugado con oro (Figura 5) solo detecta la presencia de enzima, y no su actividad. La inactivación funcional de la fitasa BP17 con un inhibidor específico siguió dando un resultado positivo con esta forma del ensayo.

Estos resultados demostraron claramente la necesidad de un ensayo en el que la actividad de una enzima —tal como la fitasa BP17— pudiera ser medida directamente, en vez de depender de la suposición de que la enzima estuviera activa simplemente porque seguía presente. El dispositivo de ensayo de la presente invención satisface esa necesidad.

- 5 Los documentos WO2005/014847 y WO2007/001895 describen un ensayo que se basa en el mismo principio que el ensayo con oro. Presuntamente, los ensayos solo detectan fitasa activa con medición del pienso tratado con calor con el equipo de reactivos ELISA descrito. Esto puede no ser correcto, ya que la fitasa es destruida y eliminada junto con la matriz de pienso en la preparación de la muestra. Por lo tanto, el equipo de reactivos puede en realidad no ser capaz de discriminar entre la fitasa activa que está presente y la fitasa no activa que está presente.

10 *Parte 2*

En estos experimentos, los inventores proporcionan detalles sobre la metodología de detección para detectar la xilanasa activa en una muestra usando el dispositivo y los métodos de la presente invención.

Ejemplo i

- 15 La metodología usada en este Ejemplo es un sistema de detección basado en una metodología de azúcares reductores. En este sentido, los inventores adaptaron la metodología descrita en Chong et al “Determination of reducing sugars in the nanomole range with tetrazolium blue” (Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 11 (1985) 109-115). En esa metodología (que es un ensayo en placa), se detecta un azúcar reductor (tal como la xilosa) calentando (95°C durante 3 minutos o 55°C durante 1 hora) la muestra de azúcar con cloruro de azul de tetrazolio y tartrato de sodio y potasio en NaOH.

- 20 En la metodología de los inventores para detectar xilanasa activa en una muestra usando el dispositivo y los métodos de la presente invención, detectan la producción del azúcar reductor (por ejemplo, xilosa) por la actividad enzimática de la xilanasa sobre su sustrato de xilano mediante incubación a temperatura ambiente sustituyendo el cloruro de azul de tetrazolio con cloruro de nitroazul de tetrazolio. El cloruro de nitroazul de tetrazolio es de la misma familia de sustratos usada en la metodología de la fitasa (anteriormente) descrita en la Parte 1.

- 25 Los datos son presentados en la Figura 26. En este sentido:

Fila superior (de la Figura 26), de izquierda a derecha:

Xilosa pura (5 µL de solución al 1%), seguida por disoluciones dobles (xilosa al 0,5-0,0001%) y un control de cero en el extremo más a la derecha

Fila inferior (de la Figura 26), de izquierda a derecha:

- 30 Ensayos de xilanasa que contenían 5 µL de 10 U/mL de xilanasa en el primer pocillo, seguidos por disoluciones dobles de la enzima (5-0,001 U/mL de xilanasa) y un control de cero en el extremo más a la derecha. Cada pocillo también contenía 5 µL de (sustrato de) 1% xilano al 1% en tampón acetato (0,25 M, pH 4,5). Después de mezclar entre sí la xilanasa y el xilano en cada pocillo, se incubó la placa durante 60 minutos a 37°C para dejar que la enzima reaccionara con su sustrato.

- 35 En la metodología de los inventores, se añadieron 200 µL de una “solución de revelado” a cada pocillo y la placa fue puesta a 55°C durante 1 hora y luego fotografiada. La solución de revelado contiene 1 mg/mL de azul de tetrazolio, 0,5 M de tartrato de sodio y potasio y 0,05 M de NaOH.

- 40 La metodología de los inventores de azúcar reductor detecta 5 µL de xilosa al 0,031% (fila superior, pocillo 6 desde el extremo más a la izquierda) y aproximadamente 5 µL de 0,1 U/mL de xilanasa en el ensayo enzimático (fila inferior, pocillo 7 desde el extremo más a la izquierda).

Ejemplo ii

- 45 La metodología usada en este Ejemplo también es un sistema de detección basado en una metodología de azúcares reductores. La metodología usada en este Ejemplo es igual que la de la anterior fila superior del Ejemplo i (xilosa 1-0,0001%), salvo que el azul de tetrazolio fue sustituido con nitroazul de tetrazolio y se dejó que la reacción se revelara a temperatura ambiente durante 60 minutos. Los datos son presentados en la Figura 27.

Ejemplo iii

La metodología descrita en el Ejemplo i o el Ejemplo ii puede ser usada en un dispositivo de ensayo o un método según la presente invención para detectar xilanasa activa en una muestra. En este sentido, la metodología de detección de xilanasa está incorporada en un ensaño rápido similar al descrito en la (anterior) Parte 1.

- 50 Así, de manera similar al ensayo de fitasa mencionado anteriormente, se captura la xilanasa de un extracto complejo de pienso en un anticuerpo suscitado contra una xilanasa deseada o adecuada. En la metodología, la enzima xilanasa

es expuesta al sustrato de xilano y la xilosa producida resultante es detectada, por ejemplo, por el ensayo de azúcar reductor de tetrazolio. La Figura 28 presenta un esquema de esta metodología.

5 Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y el sistema de la presente invención descritos resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Aunque la presente invención ha sido descrita en conexión con realizaciones preferentes específicas, debería entender que la invención reivindicada no debería ser indebidamente limitada a tales realizaciones específicas. De hecho, está previsto que diversas modificaciones de los modos descritos para la realización de la invención que son obvias para los expertos en bioquímica y campos relacionados se encuentren dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**Listado de secuencias**

- 10 <110> Danisco A/S
- <120> Ensayo
- <130> P043539PCT
- <150> 11184930.3
- <151> 12-10-2011
- 15 <150> GB 1111634.0
- <151> 07-07-2011
- <150> GB 1117309.3
- <151> 07-10-2011
- 20 <150> US 61/545237
- <151> 10-10-2011
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 413
- 25 <212> PRT
- <213> Buttiauxella sp.
- <400> 1

ES 2 705 533 T3

Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg  
 20 25 30  
 Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr  
 35 40 45  
 Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr  
 50 55 60  
 Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys Pro  
 65 70 75 80  
 Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Thr Asp Val Ala Gln Arg Thr Leu  
 85 90 95  
 Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu  
 100 105 110  
 Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe His  
 115 120 125  
 Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln Gln  
 130 135 140

ES 2 705 533 T3

Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln His  
145 150 155 160

Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser Lys  
165 170 175

Ser Pro Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu Gly  
180 185 190

Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu Val  
195 200 205

Ser Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe  
210 215 220

Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn Ile  
225 230 235 240

His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Leu Leu Leu Lys Leu His Asn Val Tyr  
245 250 255

Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly Thr  
260 265 270

Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr Glu  
275 280 285

Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile Ala  
290 295 300

Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met Arg  
305 310 315 320

Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala Leu  
325 330 335

Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser Val  
340 345 350

Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro Leu  
355 360 365

Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys  
370 375 380

Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg  
385 390 395 400



ES 2 705 533 T3

Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln  
 405 410

<210> 2  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 5 <213> Buttiauxella sp.  
 <400> 2

Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile Leu  
 1 5 10 15

Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg  
 20 25 30

Asp Val Thr Pro Asn Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr  
 35 40 45

Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr  
 50 55 60

Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Ser Gln Gly Ser Cys Pro  
 65 70 75 80

Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Thr Asp Val Asp Gln Arg Thr Leu  
 85 90 95

Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu  
 100 105 110

Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe His  
 115 120 125

Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln Gln  
 130 135 140

Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln His  
 145 150 155 160

Tyr Ile Pro Ser Leu Ala Leu Met Asn Thr Thr Leu Asn Phe Ser Lys  
 165 170 175

Ser Pro Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Ser Cys Asp Leu Gly  
 180 185 190

Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu Val  
 195 200 205

Ser Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe

ES 2 705 533 T3

210 215 220

Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Ala Ala Trp Gly Asn Ile  
 225 230 235 240

His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Leu Leu Leu Lys Leu His Asn Val Tyr  
 245 250 255

Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly Thr  
 260 265 270

Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr Glu  
 275 280 285

Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile Ala  
 290 295 300

Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met Arg  
 305 310 315 320

Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala Leu  
 325 330 335

Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser Val  
 340 345 350

Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro Leu  
 355 360 365

Ser Leu Asn Gln Pro Ala Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys  
 370 375 380

Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg  
 385 390 395 400

Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln  
 405 410

<210> 3  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 5 <213> Buttiauxella sp.

<400> 3

Asn Asp Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Val Ile Leu  
 1 5 10 15

Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Met Thr Gln Thr Met Arg  
 20 25 30

ES 2 705 533 T3

Asp Val Thr Pro Tyr Thr Trp Pro Glu Trp Pro Val Lys Leu Gly Tyr  
 35 40 45  
 Ile Thr Pro Arg Gly Glu His Leu Ile Ser Leu Met Gly Gly Phe Tyr  
 50 55 60  
 Arg Gln Lys Phe Gln Gln Gln Gly Ile Leu Pro Arg Gly Ser Cys Pro  
 65 70 75 80  
 Thr Pro Asn Ser Ile Tyr Val Trp Thr Asp Val Ala Gln Arg Thr Leu  
 85 90 95  
 Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro Gln Cys Gly Leu  
 100 105 110  
 Thr Ile His His Gln Gln Asn Leu Glu Lys Ala Asp Pro Leu Phe His  
 115 120 125  
 Pro Val Lys Ala Gly Ile Cys Ser Met Asp Lys Thr Gln Val Gln Gln  
 130 135 140  
 Ala Val Glu Lys Glu Ala Gln Thr Pro Ile Asp Asn Leu Asn Gln Arg  
 145 150 155 160  
 Tyr Ile Pro Glu Leu Ala Leu Met Asn Thr Ile Leu Asn Phe Ser Lys  
 165 170 175  
 Ser Pro Trp Cys Gln Lys His Ser Ala Asp Lys Pro Cys Asp Leu Ala  
 180 185 190  
 Leu Ser Met Pro Ser Lys Leu Ser Ile Lys Asp Asn Gly Asn Glu Val  
 195 200 205  
 Ser Leu Asp Gly Ala Ile Gly Leu Ser Ser Thr Leu Ala Glu Ile Phe  
 210 215 220  
 Leu Leu Glu Tyr Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly Asn Ile  
 225 230 235 240  
 His Ser Glu Gln Glu Trp Ala Leu Leu Leu Lys Leu His Asn Val Tyr  
 245 250 255  
 Phe Asp Leu Met Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Ala Arg His Lys Gly Thr  
 260 265 270  
 Pro Leu Leu Gln Ala Ile Ser Asn Ala Leu Asn Pro Asn Ala Thr Glu  
 275 280 285

ES 2 705 533 T3

Ser Lys Leu Pro Asp Ile Ser Pro Asp Asn Lys Ile Leu Phe Ile Ala  
 290 295 300

Gly His Asp Thr Asn Ile Ala Asn Ile Ala Gly Met Leu Asn Met Arg  
 305 310 315 320

Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Ala Leu  
 325 330 335

Val Phe Glu Arg Leu Ala Asp Lys Ser Gly Lys Gln Tyr Val Ser Val  
 340 345 350

Ser Met Val Tyr Gln Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ser Gln Thr Pro Leu  
 355 360 365

Ser Leu Asn Gln Pro Pro Gly Ser Val Gln Leu Lys Ile Pro Gly Cys  
 370 375 380

Asn Asp Gln Thr Ala Glu Gly Tyr Cys Pro Leu Ser Thr Phe Thr Arg  
 385 390 395 400

Val Val Ser Gln Ser Val Glu Pro Gly Cys Gln Leu Gln  
 405 410

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> motivo de sitio activo de fitasa HAP

<220>

<221> característica\_nueva

10 <222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica\_nueva

15 <222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 4

Arg His Gly Xaa Arg Xaa Pro  
 1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo (1) de ensayo para detectar la enzima activa en una muestra, comprendiendo dicho dispositivo:
- (a) una región (10) de colocación en la que puede colocarse la muestra;
- 5 (b) una matriz (20) operativamente conectada a dicha región (10) de colocación, de modo que la muestra, cuando esté presente (tal como colocada) en dicha región (10) de colocación pueda migrar a lo largo de dicha matriz (20);
- (c) al menos una ubicación diferenciada (30) de captura en dicha matriz (20), estando cada ubicación diferenciada (30) de captura alejada de la región (10) de colocación, y pudiendo migrar la muestra a través de dicha ubicación diferenciada (30) de captura;
- 10 (d) medios (40) de captura que están presentes en cada ubicación diferenciada (30) de captura o que la definen, siendo dichos medios (40) de captura capaces de unirse con dicha enzima, de modo que al menos una porción de dicha muestra de dicha enzima quede retenida en al menos una ubicación diferenciada (30) de captura;
- (e) un medio (50) de indicación selectiva o al menos un componente del mismo para proporcionar una indicación selectiva de la presencia de la enzima activa unida a dichos medios de captura, comprendiendo el medio de indicación selectiva un reactivo o especie reactiva; y
- 15 (f) un sustrato de dicha enzima, estando unido dicho sustrato al dispositivo (1) de ensayo;
- en el que dicha enzima actúa sobre dicho sustrato para generar un resto reactivo; en el que, además, dicho resto reactivo actúa sobre dicho reactivo o especie reactiva para generar un efecto funcional.
2. Un dispositivo (1) de ensayo según la reivindicación 1 en el que dicha región (10) de colocación es una almohadilla absorbente, en la que dicha región (10) de colocación está, preferentemente, en un extremo de dicha matriz (20).
- 20 3. El dispositivo (1) de ensayo de la reivindicación 1 o 2, comprendiendo dicho dispositivo múltiples ubicaciones diferenciadas (30) de captura.
4. El dispositivo de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que dicho dispositivo comprende un reactivo de bloqueo, preferentemente en el que dicho reactivo de bloqueo está directamente unido a dicho dispositivo, siendo lo más preferible que dicho reactivo de bloqueo sea o comprenda un tensioactivo.
- 25 5. El dispositivo (1) de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la matriz (20) es o comprende nitrocelulosa.
6. El dispositivo (1) de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que dicho reactivo o especie reactiva es un compuesto de tetrazolio.
- 30 7. El dispositivo (1) de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que dicho sustrato es un sustrato de fosfatasa que usa/tiene un donador de fosfato.
8. El dispositivo (1) de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que los medios (40) de captura son anticuerpos.
- 35 9. El dispositivo (1) de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que dicha muestra se deriva de un pienso o un aditivo para pienso.
10. El dispositivo (1) de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que dicha enzima es una fosfatasa ácida, preferentemente una 6-fitasa.
- 40 11. El dispositivo (1) de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que dicha migración es en una dirección longitudinal y en el que dichas ubicaciones (30) de captura son perpendiculares al flujo migratorio de la muestra.
12. El dispositivo de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que dicho dispositivo es una tira o un bastoncillo.
- 45 13. Un método de determinación de la presencia de una enzima activa en una muestra en el que la muestra es colocada en la región (10) de colocación del dispositivo (1) de ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y el medio (50) de indicación selectiva de dicho dispositivo indica si está presente la enzima activa.
14. Un equipo de reactivos que comprende el dispositivo (1) de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

**15.** Un método de determinación de la presencia de una enzima activa en una muestra, comprendiendo el método las etapas de:

- a) poner en contacto al menos una porción de la muestra con un medio de captura, con lo que la enzima es capturada por dicho medio de captura;
- 5 b) proporcionar un sustrato adecuado para la enzima capturada, reaccionando dicho sustrato con dicha enzima capturada para producir un producto enzimático;
- c) proporcionar una especie reactiva capaz de reaccionar con el producto enzimático, reaccionando dicha especie reactiva con dicho producto enzimático, produciendo un producto insoluble; y
- 10 d) detectar el producto insoluble obtenido en la etapa c), correlacionándose dicha detección con la presencia y/o la cantidad de una enzima activa en dicha muestra.

Figura 1

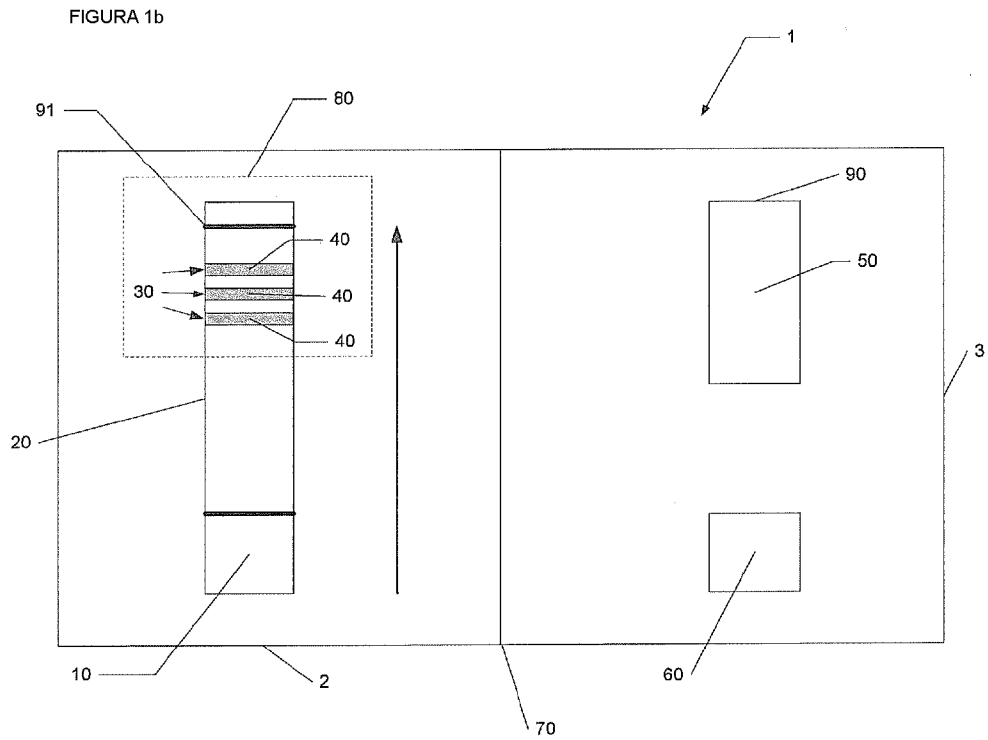
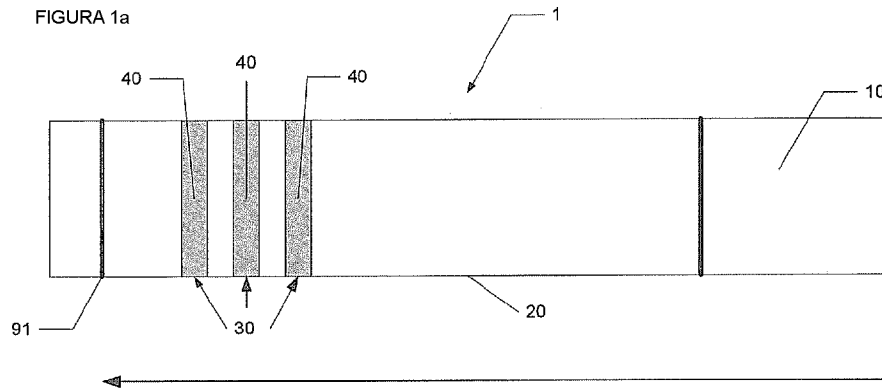


Figura 2

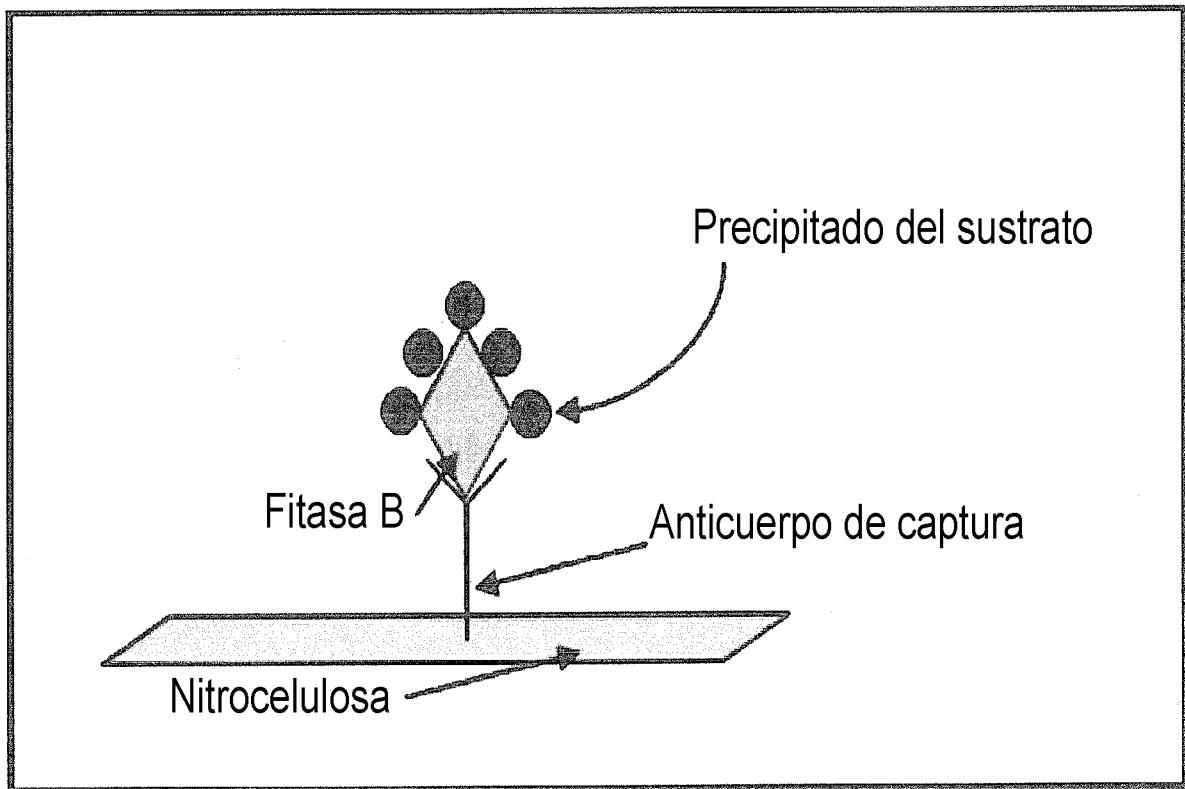


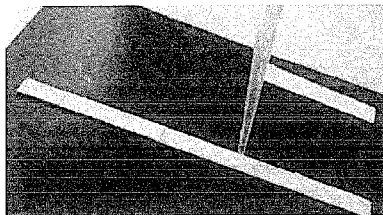


Figura 3

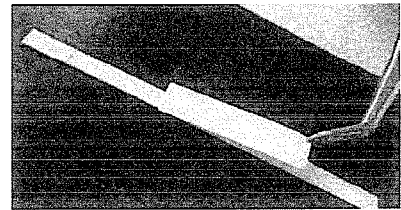
1. Adición de la muestra



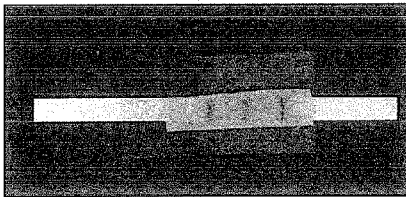
2. Adición de INT



3. Adición de PMS/AsAP NC



5. Bastoncillo a los 15 minutos



6. Extracción de la almohadilla de NC

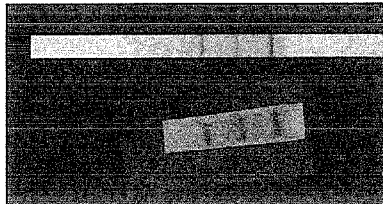


Figura 4

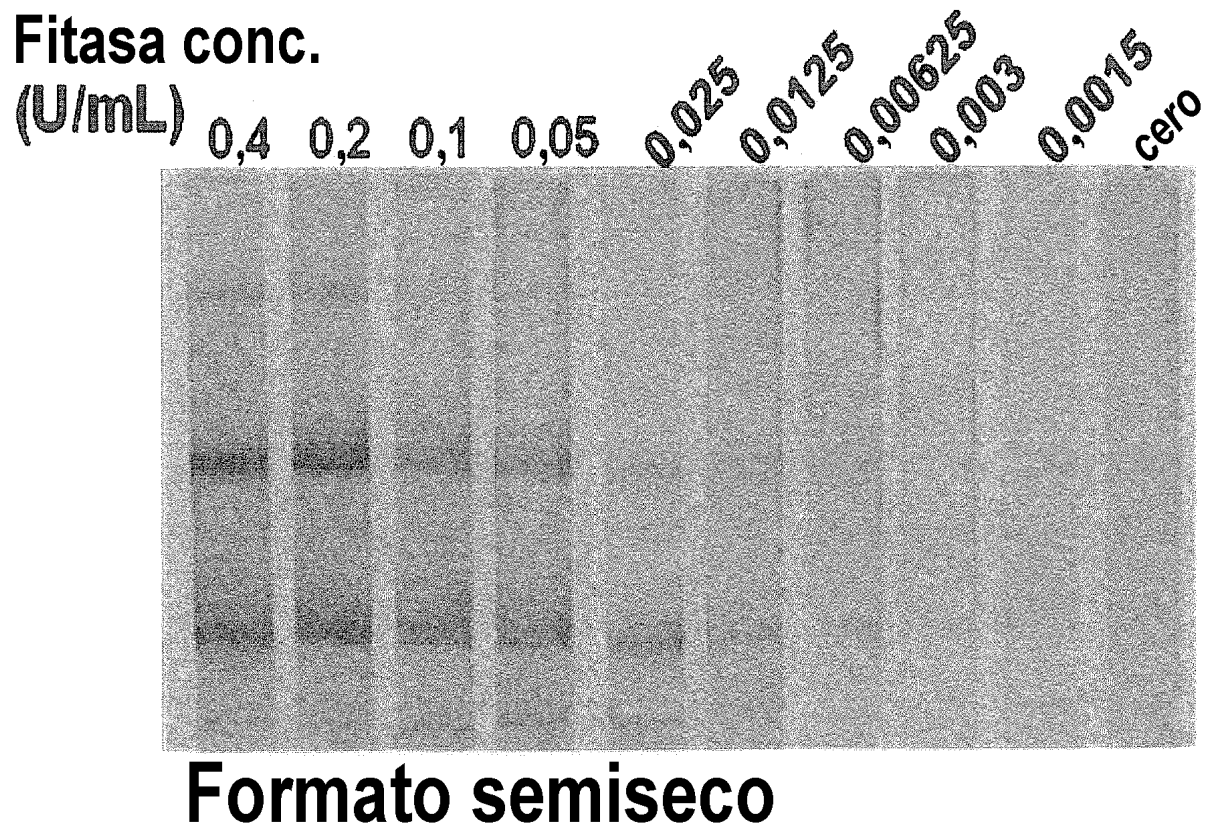


Figura 5

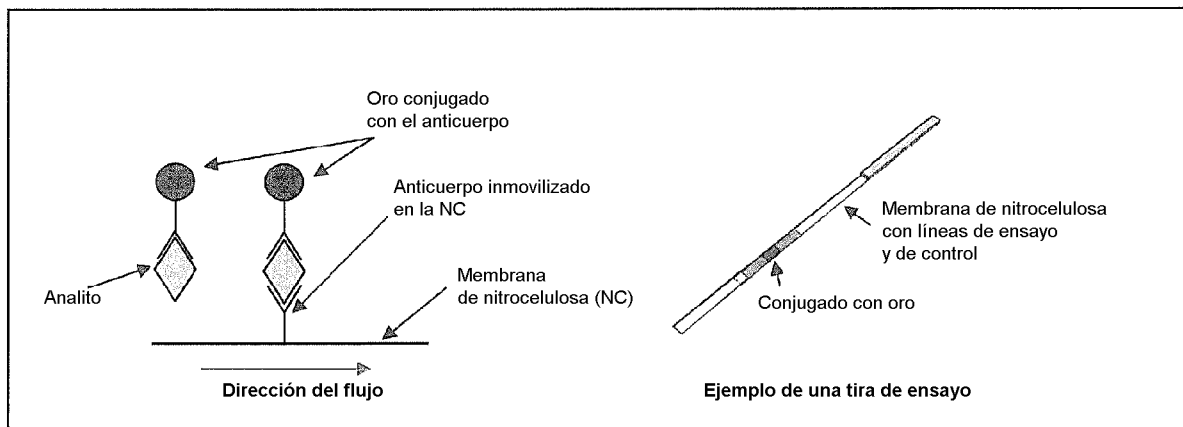


Figura 6

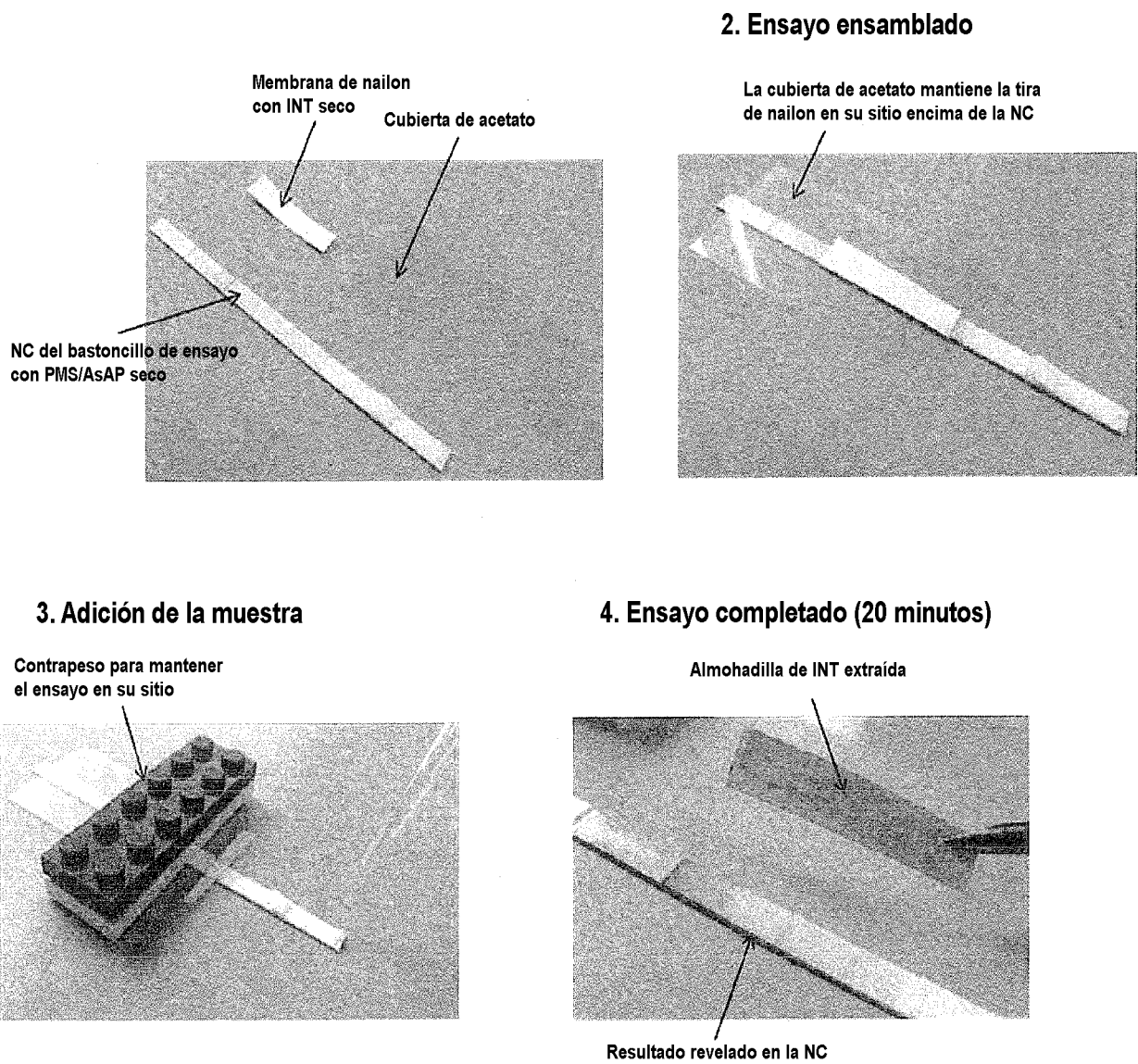


Figura 7

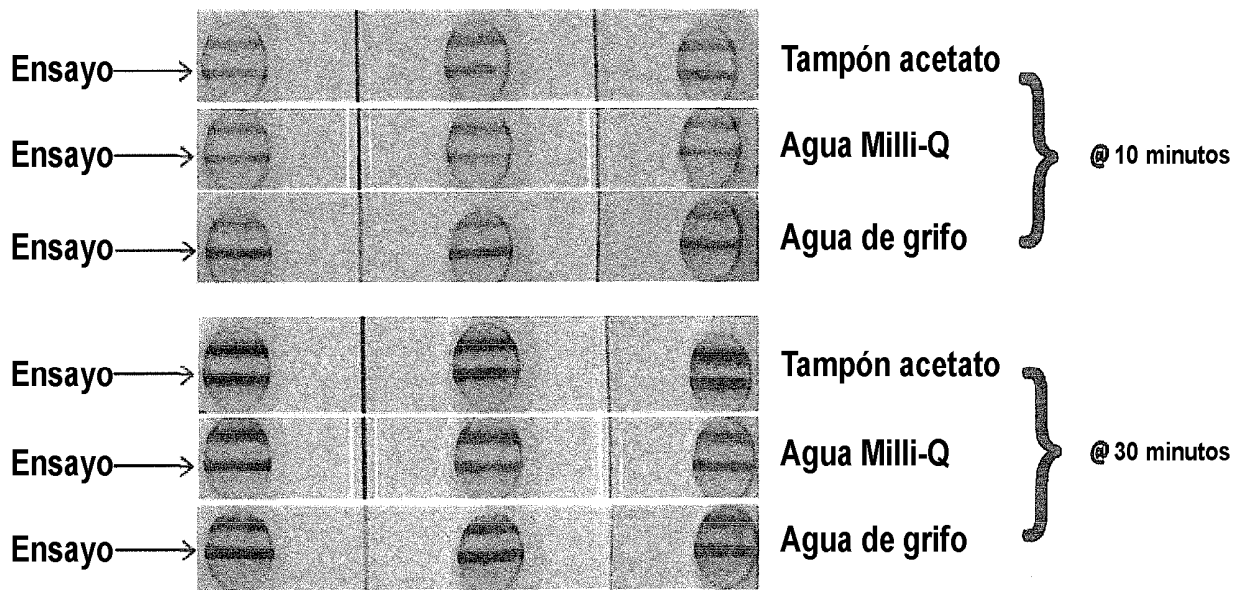


Figura 8

**Negativo**

**T=Cero**

**T= 5 min**

**T= 10 min**

**T= 20 min**

**T= 30 min**

**T= 60 min**

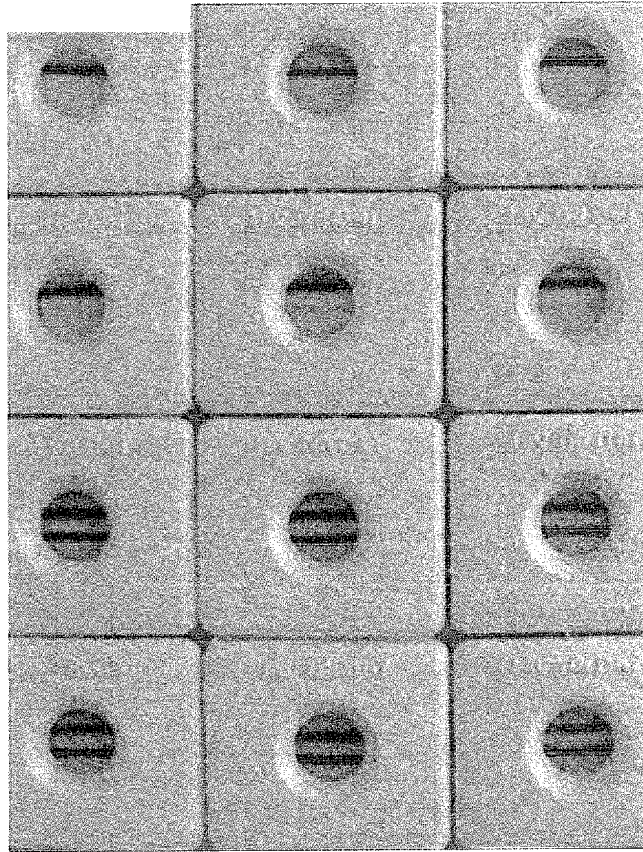
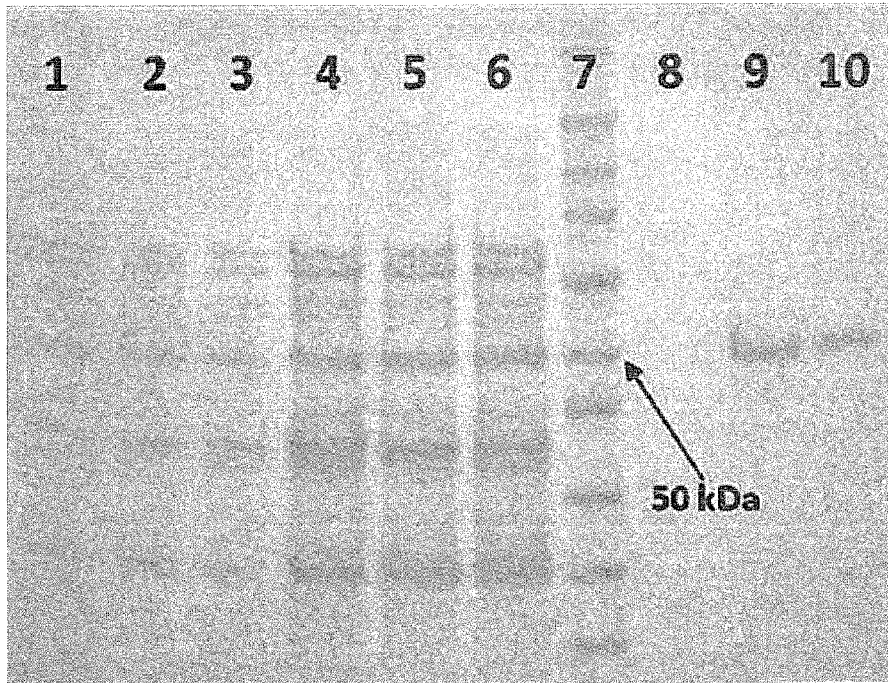


Figura 9



1. Prueba 5 - 95°C (4 µL)
2. Prueba 5 - puré (4 µL)
3. Pienso virgen (4 µL)
4. Prueba 5 - 95°C (20 µL)
5. Prueba 5 - puré (20 µL)
6. Pienso virgen (20 µL)
7. Marcadores
8. BP17 inactiva concentrada
9. BP17 activa concentrada
10. BP17 purificada (0,3 µg)

Membrana de transferencia tincionada con Ponceau S

Inmunoelectrotransferencia

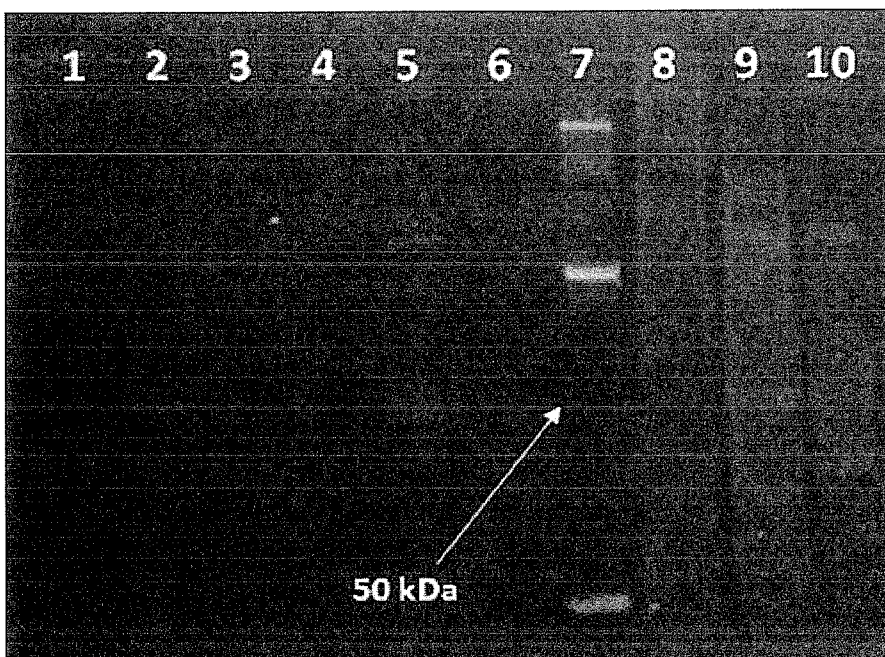




Figura 10

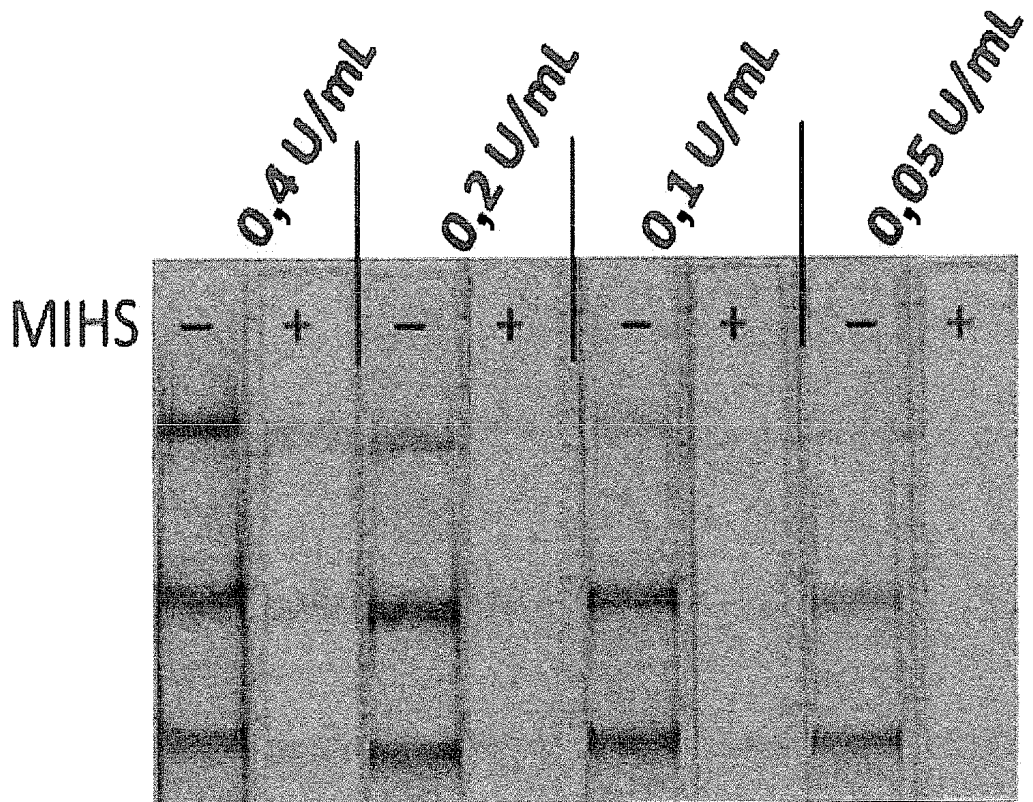
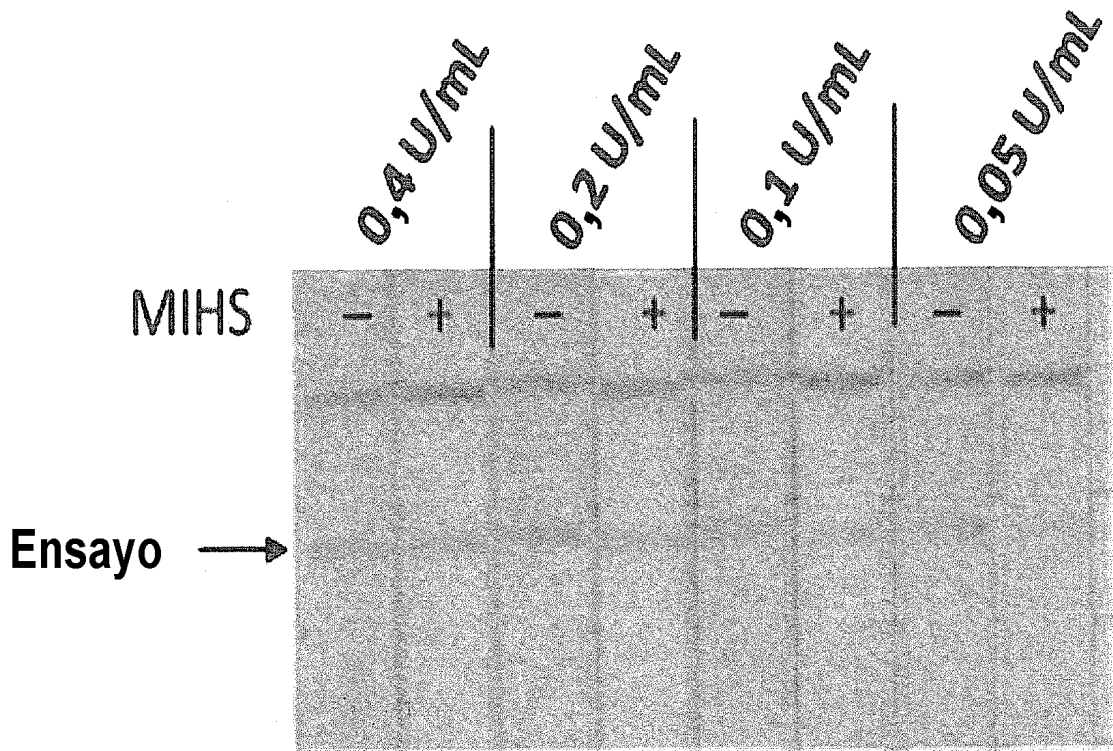
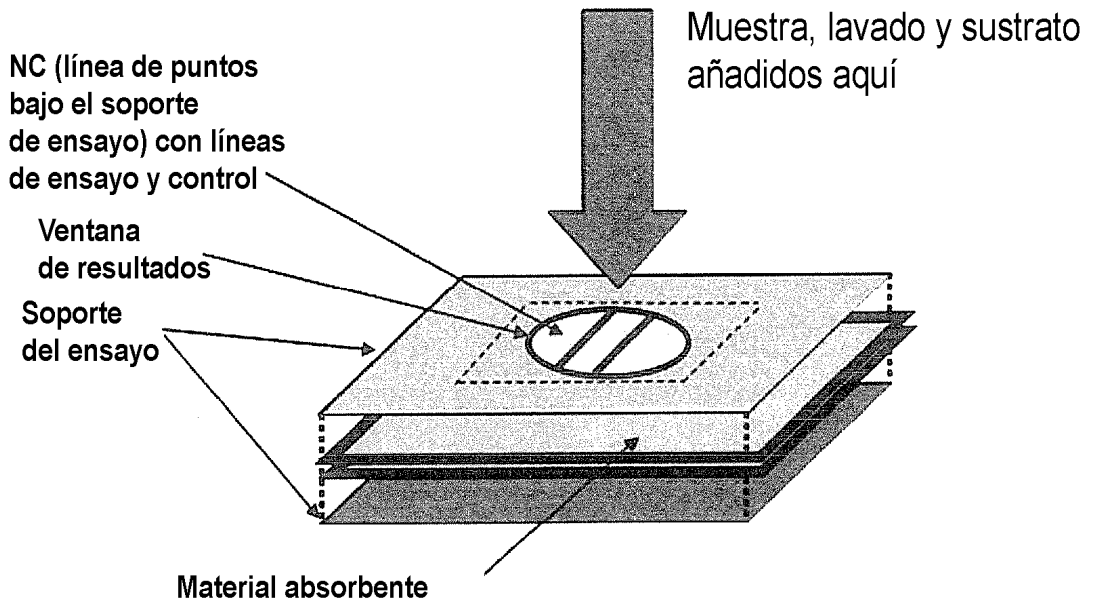




Figura 11



Ejemplo del formato de flujo pasante que muestra una respuesta de la línea de ensayo dependiente de la dosis

BP17 U/mL |-----0,5-----|-----0,2-----|-----0,05-----|-----Cero-----|

Ensayo —  
Control —

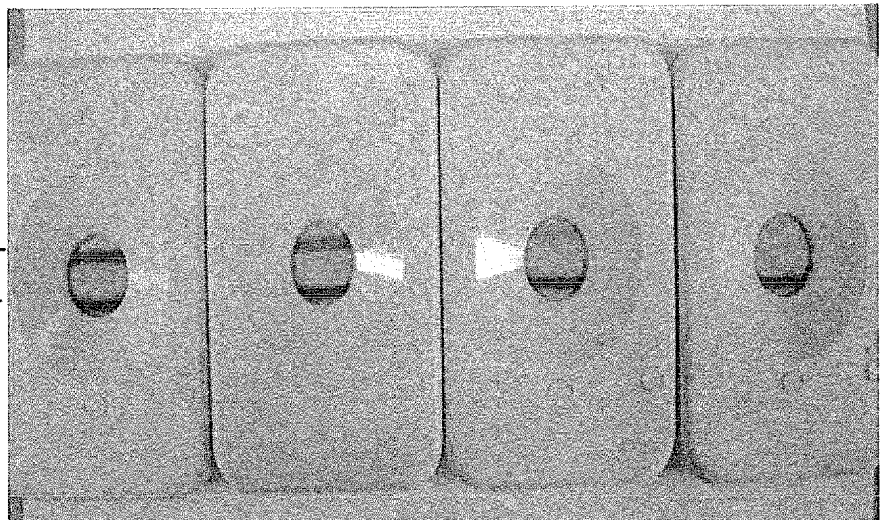


Figura 12

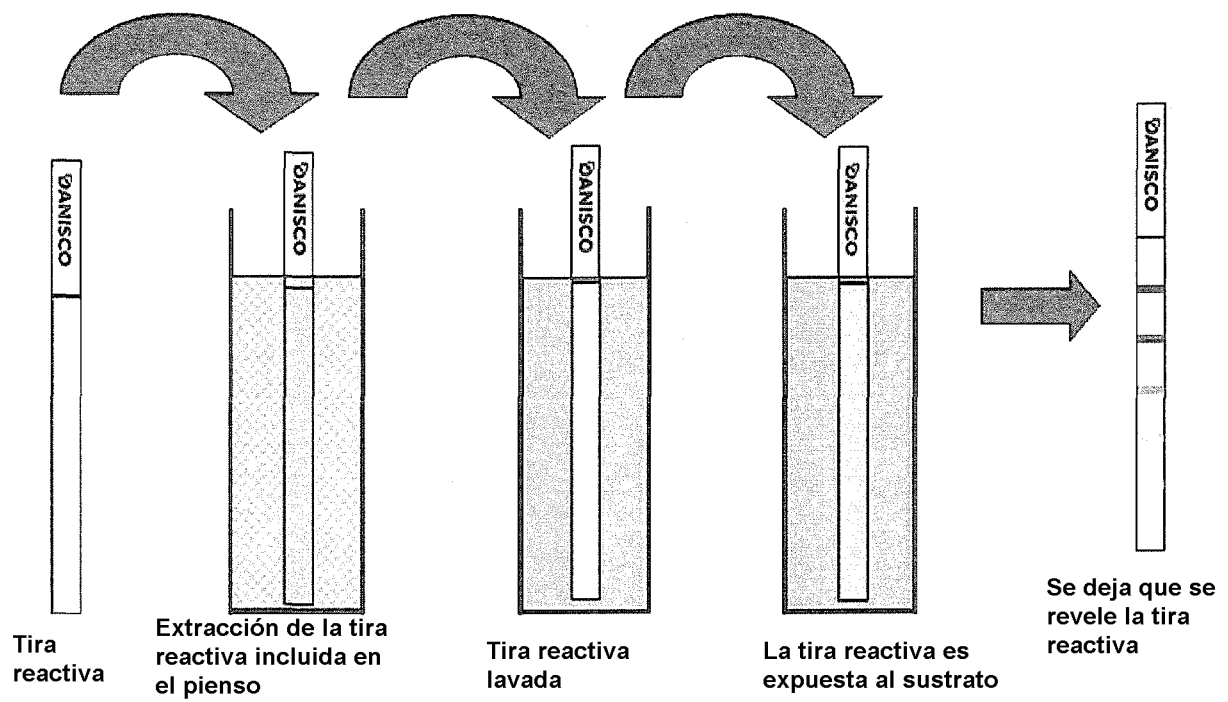


Figura 13

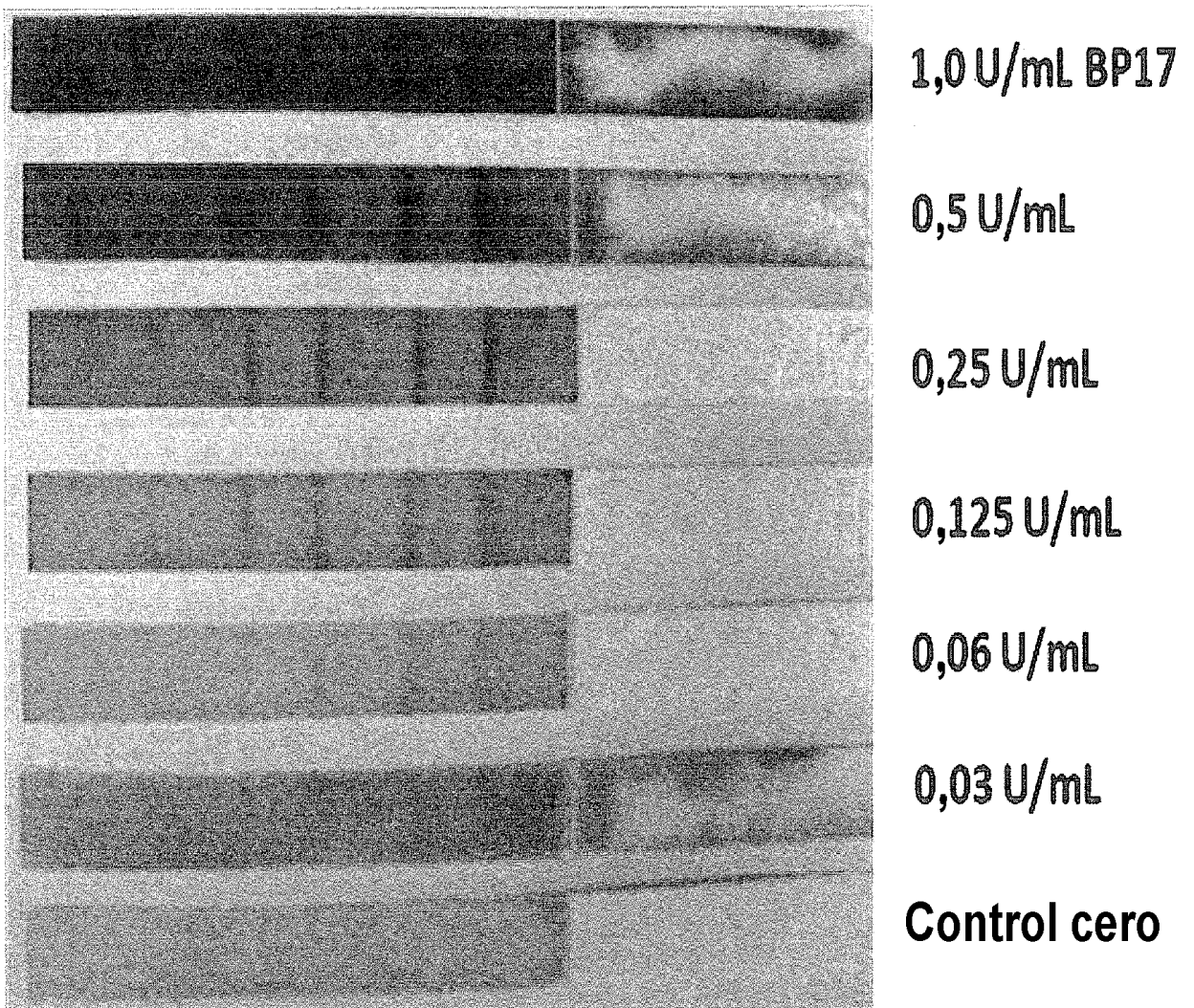


Figura 14

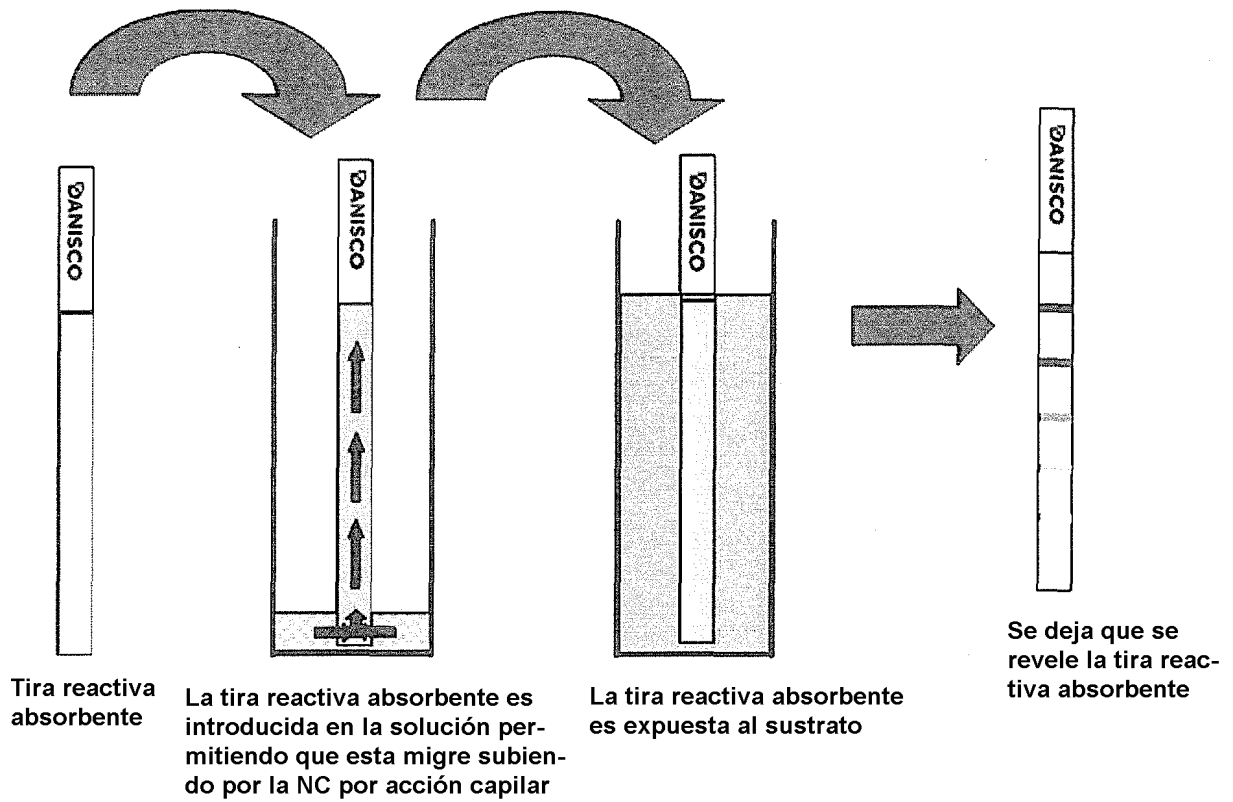


Figura 15

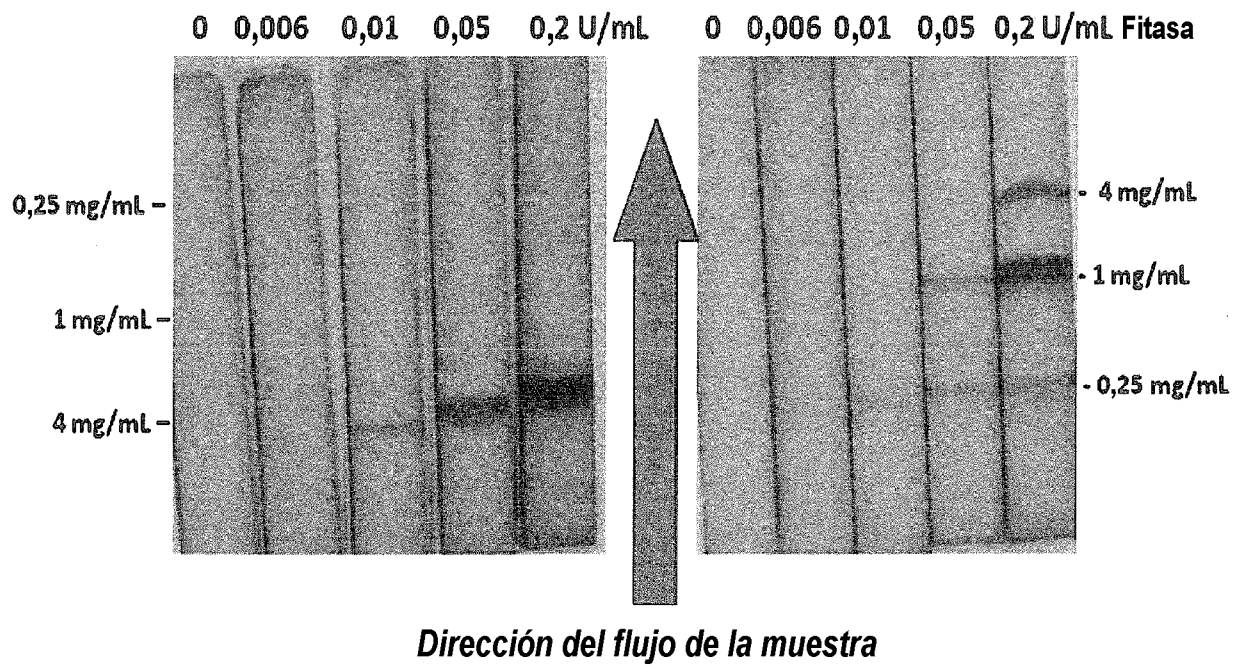


Figura 16

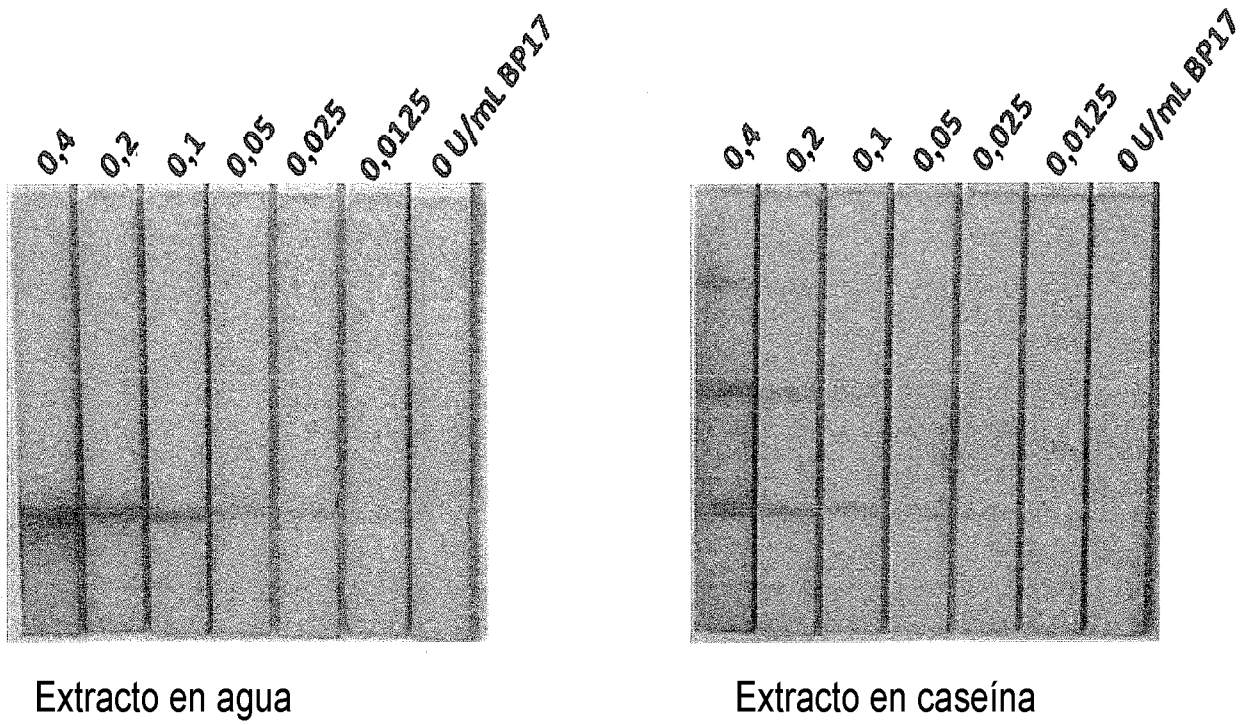


Figura 17

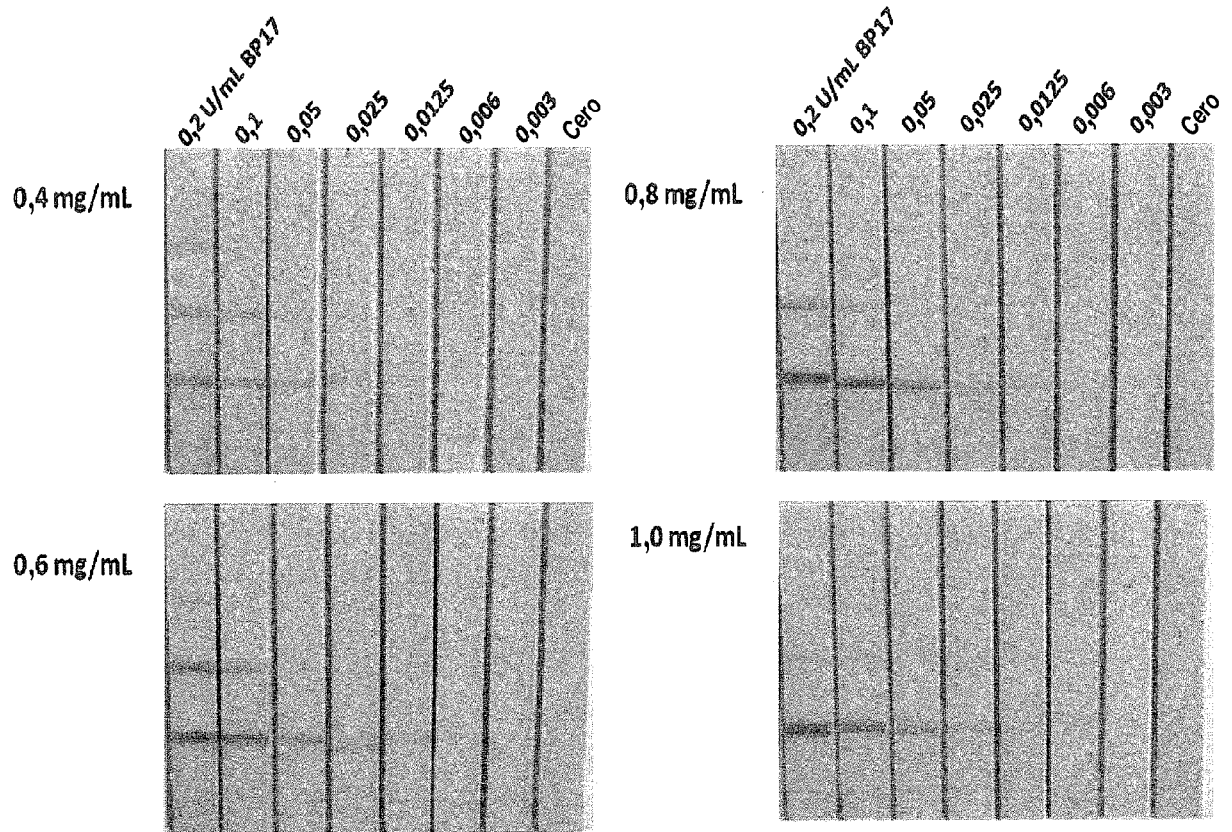


Figura 18

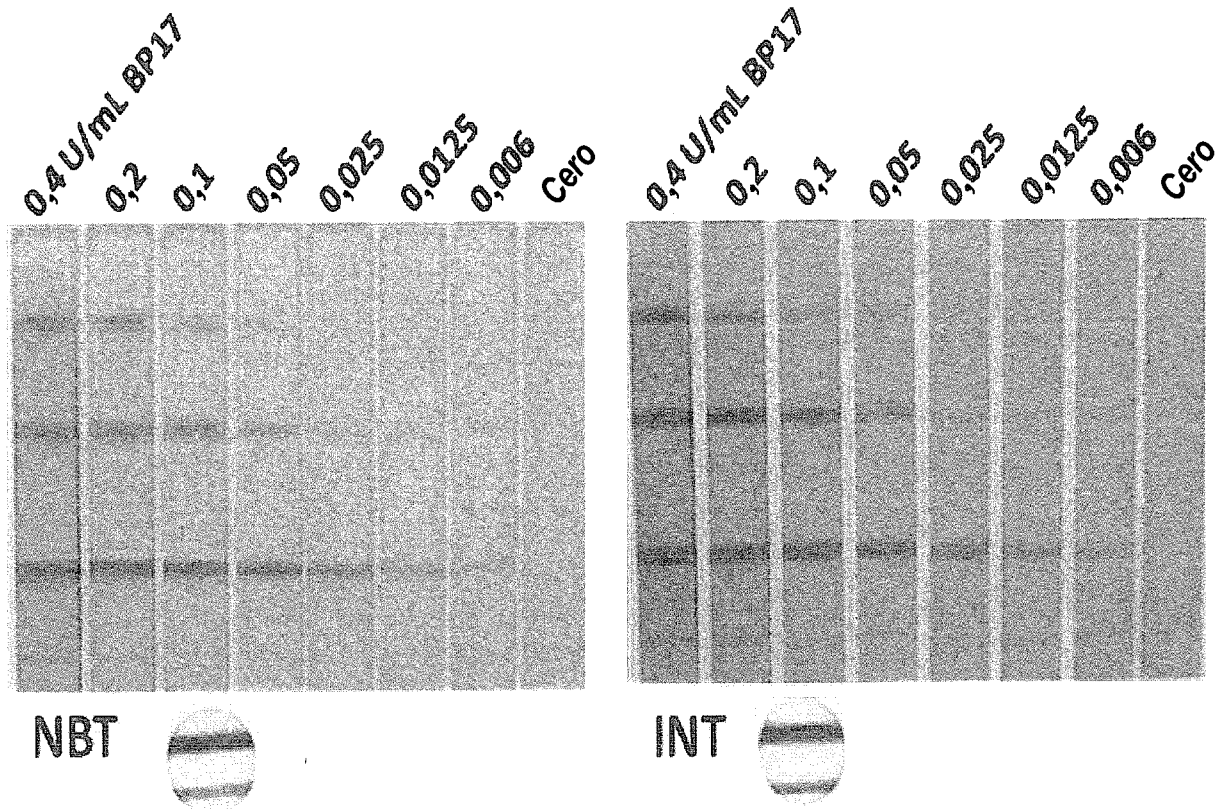




Figura 19

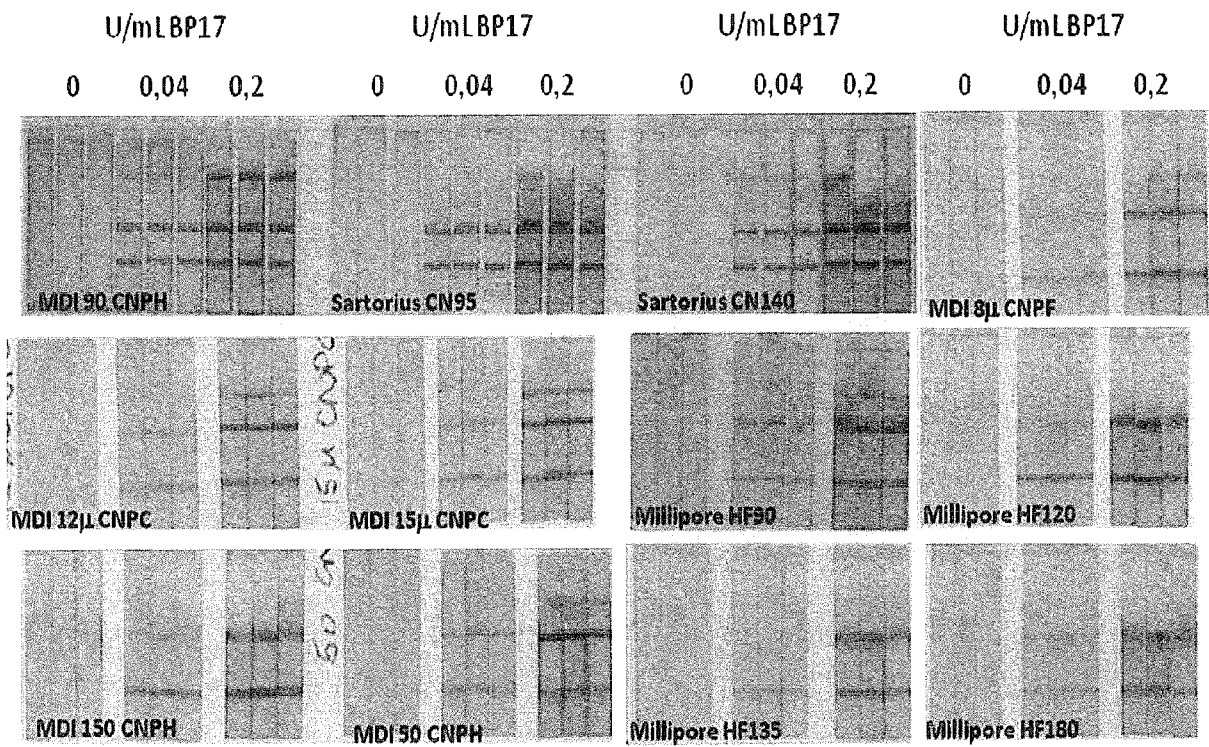


Figura 20

Todas las muestras a 0,2 U/mL. Todas las almohadillas contienen Tween al 0,1%

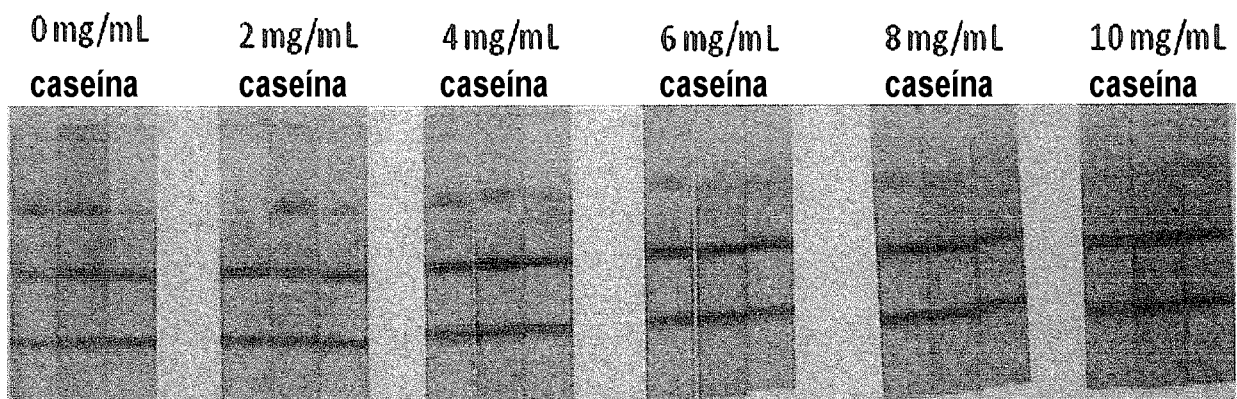


Figura 21

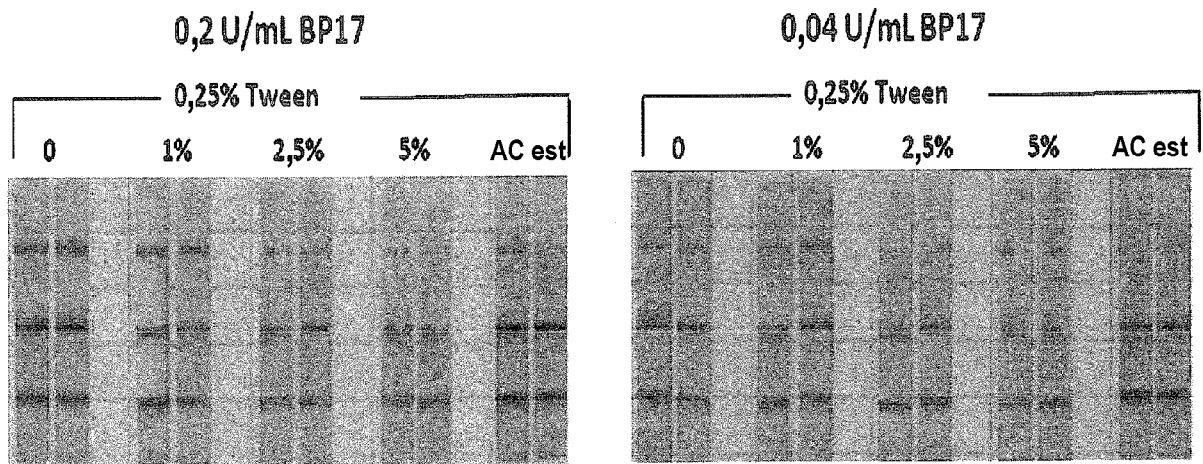
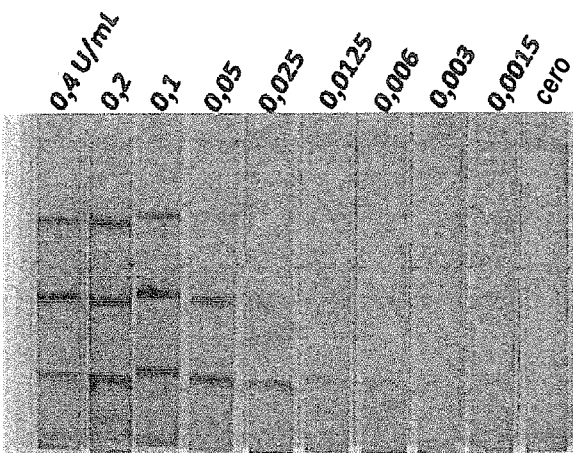
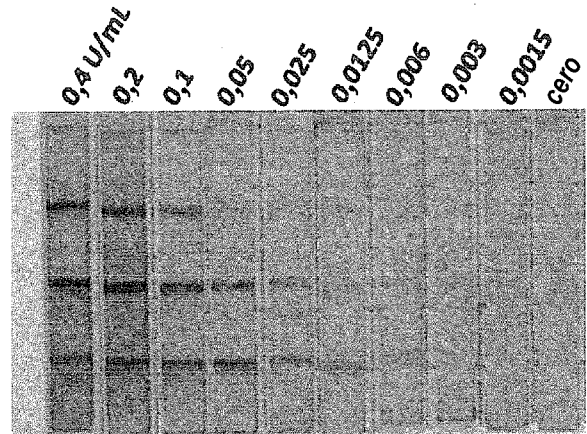


Figura 22



Sustrato INT



Sustrato NBT

Figura 23

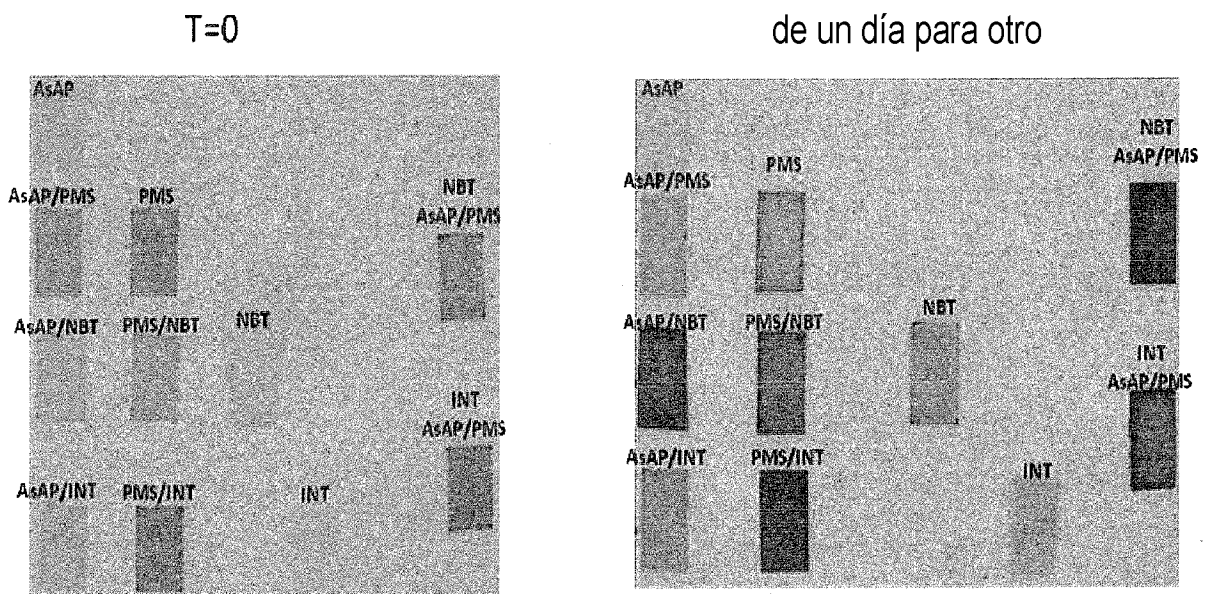


Figura 24

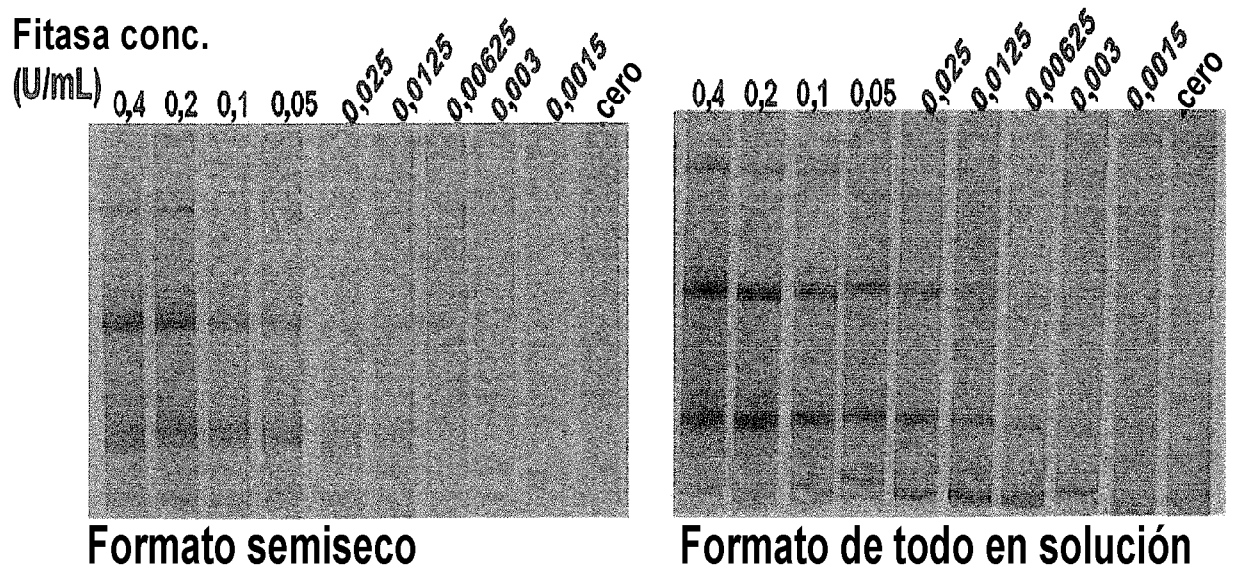


Figura 25

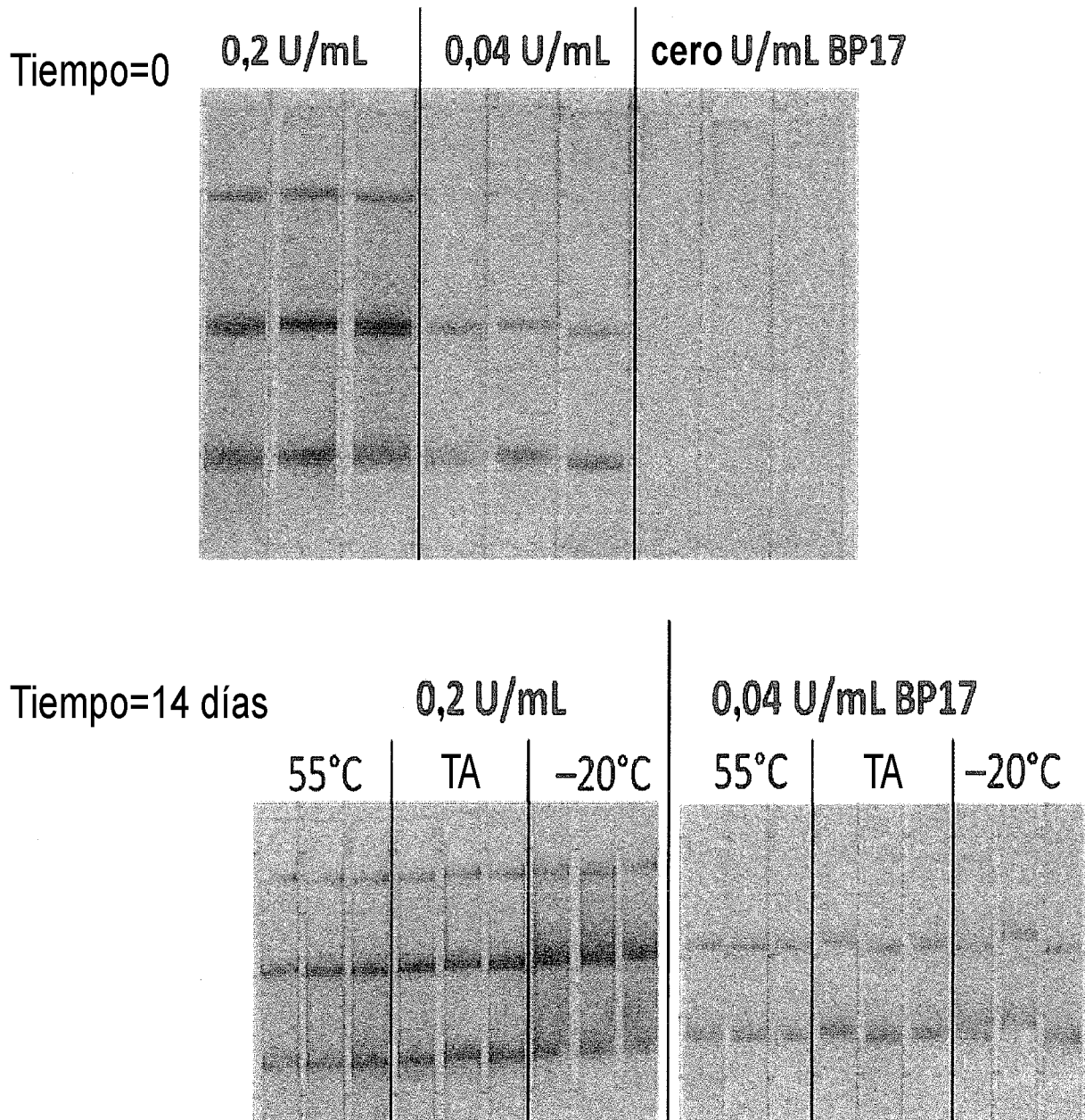


Figura 26

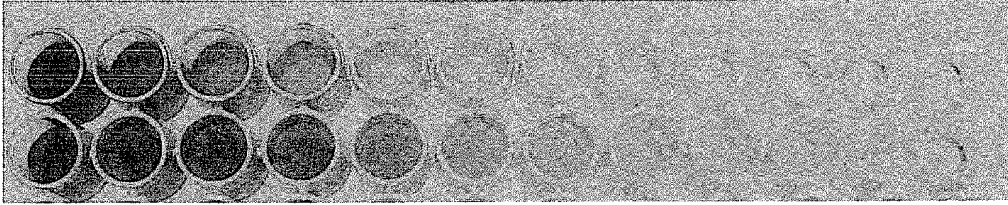


Figura 27



Figura 28

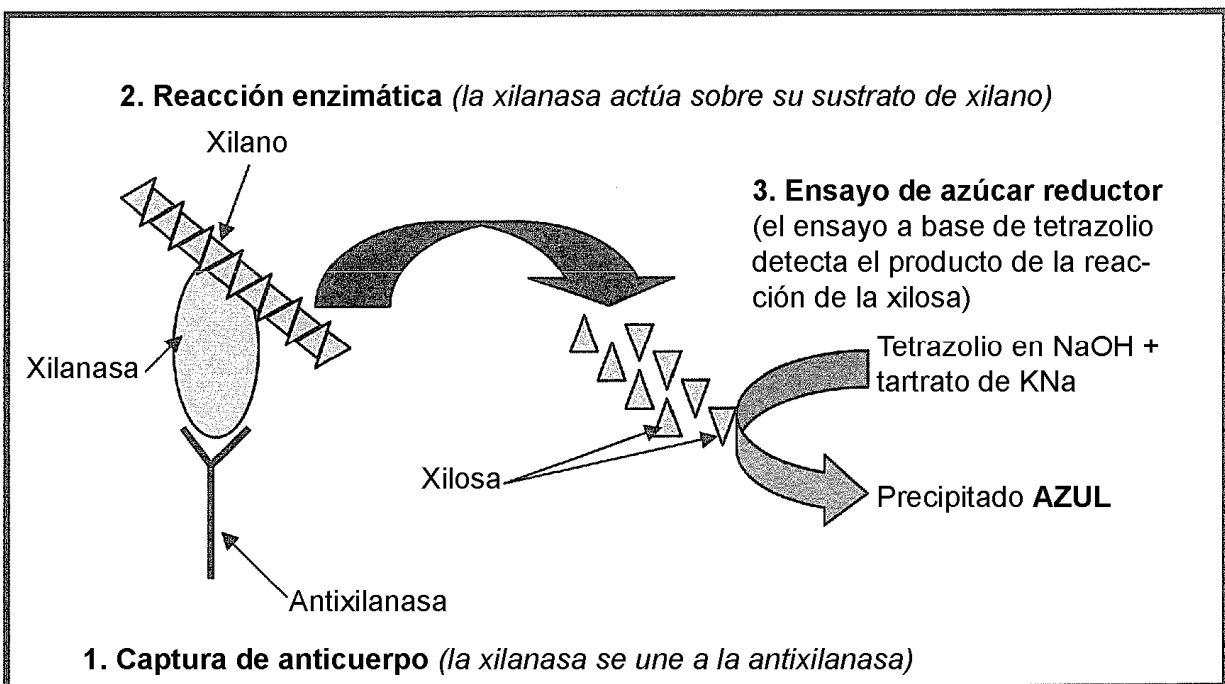
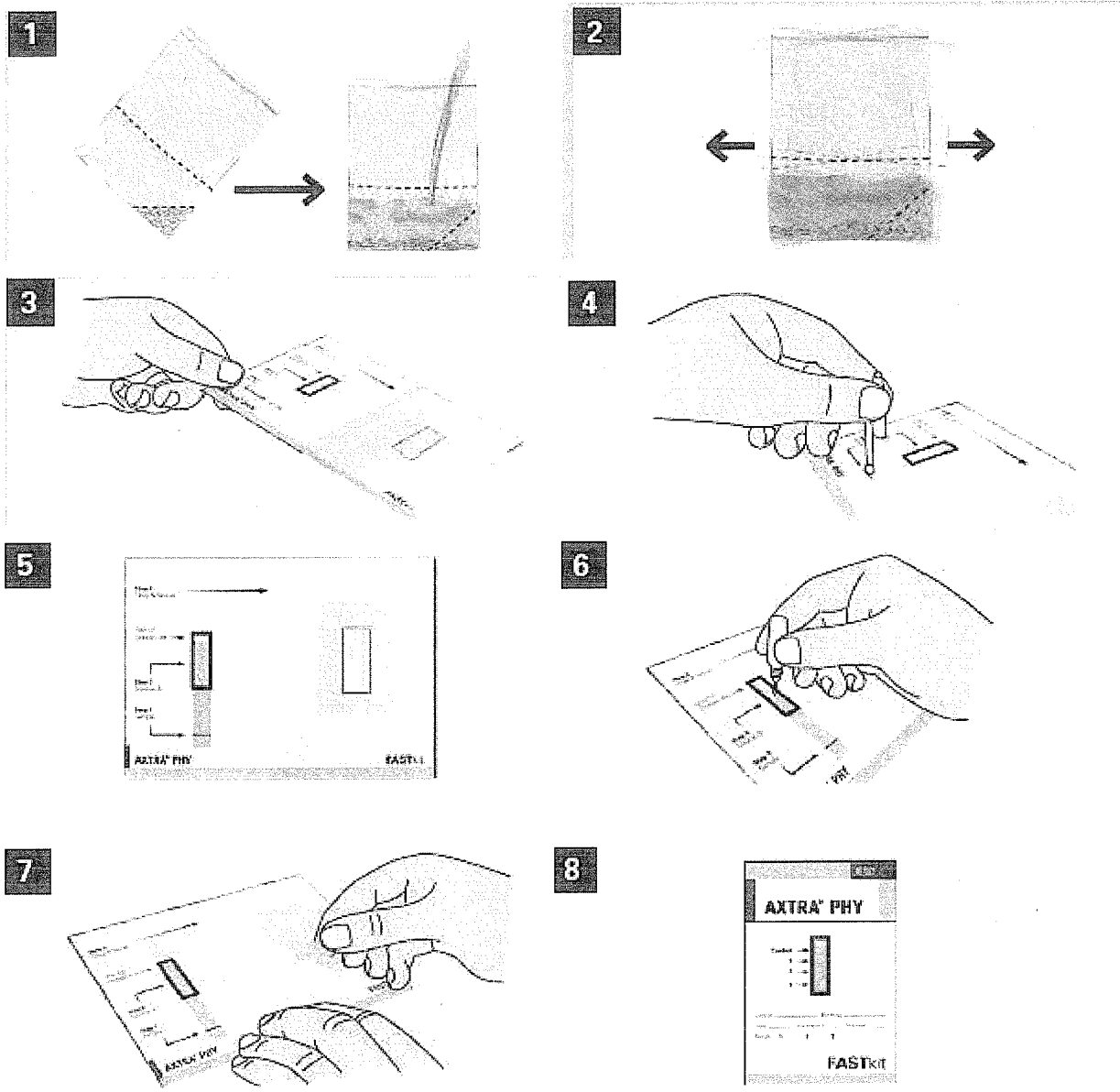




Figura 29



9	AXTRA® PHY	AXTRA® PHY	AXTRA® PHY
Control →	Control →	Control →	Control →
3 →	3 →	3 →	3 →
2 →	2 →	2 →	2 →
1 →	1 →	1 →	1 →
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____