

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 475**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2014 PCT/EP2014/058965**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177680**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2014 E 14721366 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2992332**

54 Título: **Método in vitro para la detección temprana de una posible inflamación asociada con el rechazo de un trasplante**

30 Prioridad:

03.05.2013 EP 13166375

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

06.07.2020

73 Titular/es:

**SALION GMBH (100.0%)
Sterzenweg 19
82541 Münsing, DE**

72 Inventor/es:

**ABENDROTH, DIETMAR;
STANGL, MANFRED J. y
MARZINZIG, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 771 475 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método *in vitro* para la detección temprana de una posible inflamación asociada con el rechazo de un trasplante

5 La presente invención se refiere al campo del diagnóstico. Los tratamientos médicos modernos afectan a más y más personas ya que la medicina logró un progreso sustancial en el tratamiento de enfermedades, en particular, al reemplazar partes del cuerpo u órganos mediante la sustitución con partes procedentes de fuentes extrañas. Cuando partes del cuerpo y, en particular, órganos no funcionan correctamente, es posible trasplantar órganos o reemplazar partes del cuerpo por elementos artificiales como, por ejemplo, dientes implantados. Dichos tratamientos
10 causan frecuentemente una respuesta del cuerpo que comienza frecuentemente con una inflamación y finalmente puede dar como resultado el rechazo del trasplante.

El documento EP 2 284 540 A1 divulga un método de predicción de insuficiencia orgánica endógena causada por infección (bacteriana) y especialmente por sepsis grave simultánea. Para este propósito, la publicación de la patente requiere detectar un perfil metabólico cuantitativo de un sujeto y comparar los resultados con un perfil metabólico de referencia cuantitativo. La publicación, sin embargo, no se refiere al rechazo de un órgano trasplantado.
15

Chen et al.: "Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States", International journal of tryptophan research, febrero de 2009, páginas 1-19, divulga que la quinurenina se puede encontrar en suero, líquido cefalorraquídeo o tejido cerebral. Sin embargo, no se menciona la saliva.
20

La presente invención, sin embargo, divulga un método para detectar y diagnosticar inflamación temprana. El método describe el uso del perfil metabólico cualitativo y compara los resultados con una referencia cuantitativa. La idea detrás parece detectar respuestas inflamatorias tempranas en el sentido de detección de activación de la respuesta inmunitaria innata. Esta activación es única en varias enfermedades, especialmente al principio. Es una reacción en patógenos o moléculas llamadas alarmas y conduce a una activación del inflamósoma. La siguiente etapa es la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa al menos 6 a 7 días después.
25

El cuerpo humano reconoce que los elementos implantados dentro del cuerpo no son compatibles cuando los implantes no proceden del mismo cuerpo. Por lo tanto, la compatibilidad del implante extraño y el receptor debe examinarse cuidadosamente y las posibles acciones de rechazo deben controlarse cuidadosamente. Cuando se trasplantan órganos sólidos como el corazón, el hígado, los pulmones, el páncreas o los riñones, las acciones de rechazo del cuerpo receptor generalmente disminuyen mediante un tratamiento adecuado con medicamentos. El efecto secundario no deseado es, sin embargo, que la disminución de la respuesta del cuerpo contra el trasplante con frecuencia causa simultáneamente una disminución de la respuesta inmunitaria.
30
35

En consecuencia, un paciente que recibe un trasplante debe ser controlado con mucho cuidado con respecto a una posible infección (por ejemplo, bacteriana o vírica), ya que dicha infección puede ser mortal para el paciente que recibió un trasplante. El complejo tratamiento médico de una persona que ha recibido un trasplante tiene, sin embargo, el efecto secundario no deseado de que un paciente no se da cuenta de los primeros signos de una infección y/o inflamación. El rechazo de un trasplante puede causar una inflamación pero el paciente normalmente no reconoce las primeras etapas debido al tratamiento médico después del trasplante. El paciente se dará cuenta solo en una etapa posterior de que él o ella padece de una inflamación que, sin embargo, tiene la consecuencia no deseada de que puede ser demasiado tarde para comenzar con un tratamiento adecuado para el paciente para evitar el rechazo del trasplante. Por lo tanto, existe una necesidad de un método *in vitro* simple y fiable para la detección temprana de una posible inflamación, en particular, la detección de un posible rechazo de un órgano trasplantado.
40
45

La presente invención se refiere a la ruta de la quinurenina. El triptófano es un aminoácido esencial que se puede metabolizar a través de diferentes rutas, siendo una ruta principal la ruta de la quinurenina. Esta ruta se ilustra en la Figura 1. La primera enzima de la ruta, la indolamina-2,3-dioxigenasa, se estimula fuertemente por moléculas inflamatorias, particularmente el interferón- γ . Por lo tanto, la ruta de la quinurenina a menudo se aumenta de forma sistemática cuando se activa la respuesta inmunitaria. La importancia biológica es que, por un lado, el agotamiento del triptófano y la generación de quinureninas juegan un papel modular clave en la respuesta inmunitaria. Por otro lado, se encontró sorprendentemente que el nivel de quinurenina medido en la saliva se puede usar para la detección temprana de una posible reacción de rechazo de trasplante que de otro modo no se puede detectar fácilmente.
50
55

La activación de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO 1), la principal enzima implicada en el catabolismo del triptófano, genera metabolitos inmunosupresores que contrarrestan la activación inmunitaria. El interés de los inmunólogos de trasplante en este circuito de control aumentó considerablemente después de que se pudiera demostrar que la actividad de la IDO es de importancia crítica para la aceptación inmunológica de los fetos semialojénicos en un modelo de ratón. Los datos experimentales llevaron a la hipótesis de que los linfocitos T reguladores ejercen su función inmunosupresora al iniciar la actividad de la IDO. Estos hallazgos básicos hicieron que el metabolismo del triptófano también fuera de interés para el trasplante clínico y diferentes enfermedades (Chen et al., Int. J. of
60
65

Tryptophan Research 2009; 2, 1-19).

Un método de control fiable para la medición y la predicción temprana de desarrollos inflamatorios es beneficioso para la terapia del paciente.

5 Hoy se sabe que el endotelio, una vez considerado como relativamente inerte, está implicado en diversas funciones tales como la fibrinólisis, la coagulación, el tono vascular, el crecimiento y la respuesta inmunitaria. La reacción más común en el cuerpo humano puede verse en la respuesta inflamatoria mediada por la inmunidad innata.

10 La indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), una enzima intracelular inducible por IFN- γ , cataliza la primera etapa y limita la velocidad en la degradación del aminoácido esencial triptófano en la ruta de la quinurenina. Los efectos inmunomoduladores de la IDO están representados mediante la prevención de la proliferación de linfocitos T, la promoción de la apoptosis de linfocitos T, la inducción de la ignorancia de linfocitos T, la anergia y la generación de linfocitos T reguladores. Mientras IDO emerge como un regulador de la inmunidad, su papel en el control de alorrespuesta se está desarrollando.

20 El método divulgado en el presente documento se puede usar como una herramienta de control conveniente, para medir la inflamación o la respuesta inmunitaria innata activada. A pesar del creciente reconocimiento de los mecanismos reguladores moleculares de los linfocitos T de la IDO, su papel fisiológico en la aloinmunidad y el trasplante clínico sigue siendo controvertido. Los datos experimentales disponibles indican que la manipulación genética mediante la introducción del gen IDO en aloinjertos se asocia con una supervivencia prolongada y que las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), tales como células dendríticas, pueden aumentar la expresión de la IDO y, por lo tanto, regular las respuestas inmunitarias. Asimismo, IDO actúa como un puente entre las células dendríticas y los linfocitos T reguladores (Tregs) para adquirir la función efectora completa. Estos hallazgos muestran que IDO tiene un potencial considerable para la inmunorregulación y la inducción de tolerancia específica de antígeno en el trasplante. Esto se aplica igualmente a la quinurenina. La quinurenina es el primer producto de degradación del triptófano después de la N-formil quinurenina. La quinurenina muestra la activación de una respuesta inflamatoria bastante temprano y se puede usar para la detección temprana de un episodio de rechazo.

30 La presente invención proporciona un método *in vitro* para la detección temprana de una posible inflamación que está relacionada con el rechazo de un trasplante. En dicho método, el nivel de quinurenina en la saliva se determina cuantitativamente. El valor de la quinurenina medido en el paciente a diagnosticar se compara con el valor promedio obtenido de una cohorte comparable de personas que no padecen esta enfermedad, en donde el valor de la quinurenina en pacientes que muestran signos tempranos de dicha inflamación aumenta.

40 Mientras tanto, en el método de la presente invención, es preferentemente el nivel de L-quinurenina lo que se determina, sin embargo, también es posible determinar el nivel de N-formil-quinurenina, 3-hidroxiquinurenina y ácido quinurénico. Dependiendo del método de detección, puede ser posible determinar entre los diferentes intermediarios. Es, sin embargo, también posible utilizar pruebas de determinación que reaccionan con los diferentes intermediarios. La determinación de quinurenina en la saliva se realiza cuantitativamente ya que es importante detectar cambios en el nivel de quinurenina que están fuera del intervalo regular. Es particularmente ventajoso que el método *in vitro* se pueda realizar sin un médico o personas con capacitación médica.

45 El método de la presente invención se usa preferentemente para detectar lo antes posible cualquier complicación que pueda estar relacionada con el rechazo de un órgano trasplantado. En realizaciones preferidas de la presente invención, el órgano trasplantado se selecciona de aquellos órganos que se trasplantan frecuentemente como riñón, hígado, páncreas, corazón o pulmón.

50 En otra realización, sin embargo, el método de la presente invención se puede aplicar cuando se trasplantan partes del cuerpo. Dichas partes pueden ser partes del ojo como la córnea o la retina. También se pueden trasplantar otras partes del cuerpo tal como cartílago, hueso, médula ósea o piel.

55 En una realización adicional, los trasplantes no proceden de otro ser humano o de un animal. En dicha realización, el trasplante se prepara a partir de material que no procede de otro cuerpo humano o animal. Dichos materiales pueden ser reemplazos óseos, reemplazos de articulaciones, implantes para dientes, implantes mamarios o implantes de pene, por mencionar solo algunos. Por lo general, dichos materiales se seleccionan para mantener las posibles actividades de rechazo del cuerpo al nivel más bajo posible.

60 Sin embargo, puede ser útil controlar la aceptación del trasplante y un método para la detección temprana de una posible complicación que puede conducir a un rechazo final del trasplante. El método *in vitro* de la presente invención se puede usar preferentemente para el control fácil y fiable de la recuperación de un paciente después de haber recibido un trasplante.

65 En una realización particularmente preferida de la presente invención, el método de prueba descrito en el presente documento se puede usar para el control de la terapia. Es posible detectar en una etapa muy temprana los primeros

signos de inflamación sin la necesidad de medidas invasivas. El paciente puede realizar fácilmente las pruebas utilizando su saliva y los kits de prueba proporcionados en el presente documento que permiten una indicación temprana de los posibles riesgos en la terapia.

- 5 En otra realización, la presente invención proporciona kits adecuados para realizar el método de acuerdo con la invención. Dicho kit comprende medios para la determinación de quinurenina en saliva. Dichos medios pueden funcionar en diferentes principios. Es posible usar un reactivo de color específico que detecte la presencia de quinurenina y/o derivados de quinurenina. Alternativamente, el kit puede comprender al menos uno o preferentemente dos anticuerpos que se unen específicamente a la quinurenina. Preferentemente, cuando se usan dos anticuerpos, dichos anticuerpos no se unen al mismo epítipo para permitir la formación o un emparedado formado por el primer anticuerpo, la quinurenina o su derivado y el segundo anticuerpo.

15 En una realización de la presente invención, la determinación de quinurenina o derivados de la misma se realiza mediante una reacción de coloración. La muestra en la prueba de determinación es la saliva. Antes de que se pueda determinar el contenido de quinurenina o derivados de la misma, se deben eliminar los componentes que pueden afectar negativamente el resultado correcto y preciso de la prueba. En una realización preferida, los componentes no deseados de saliva que pueden alterar el resultado correcto de la prueba se eliminan preferentemente mediante precipitación de los componentes que alteran el resultado de la medición. Dicha precipitación se puede realizar preferentemente usando ácido tricloroico. Es, sin embargo, posible utilizar otros métodos para la desproteización de la saliva que el uso del ácido tricloroico. Después de que los componentes perturbadores de la saliva se hayan eliminado mediante precipitación, puede ser necesario separar las fases mediante centrifugación. El sobrenadante se hace reaccionar entonces preferentemente con un reactivo colorante que preferentemente puede ser el reactivo de Ehrlich. Después del desarrollo del color, las muestras se miden mediante la medición de la absorbencia a una longitud de onda adecuada. Preferentemente, la prueba se realiza de manera cuantitativa o semicuantitativa. En el método de prueba, se puede usar una curva de calibración o se fija un determinado valor umbral en el kit de prueba para evitar resultados falsos positivos.

30 Se descubrió que tan pronto como el día 1 después del trasplante de un órgano sólido, la quinurenina sérica estaba significativamente elevada en pacientes que posteriormente sufrieron un episodio de rechazo agudo en comparación con aquellos que tuvieron un curso sin complicaciones después de la cirugía de trasplante. Estos cambios en el metabolismo del triptófano se utilizaron para desarrollar una nueva prueba de pronóstico para el rechazo agudo de aloinjertos de órganos sólidos. Analizar el contenido de quinurenina inmediatamente después del trasplante puede ayudar a definir el subgrupo de pacientes con mayor probabilidad de experimentar un rechazo agudo con implicaciones adicionales para la implementación inmediata de la terapia de ahorro de injerto.

35 El método de la presente invención demuestra la correlación de las actividades inflamatorias con la inflamación, como sepsis, infecciones y rechazo en más de 15.000 pruebas.

40 Los datos indican que la inmunidad innata activada es uno de los factores clave para la insuficiencia aguda y crónica del injerto. Las rutas de señalización de citocinas inducidas por el estrés oxidativo pueden proporcionar una diana más específica para nuevos inmunosupresores.

45 Los métodos de diagnóstico divulgados en el presente documento deben usarse junto con parámetros clínicos. El valor relativo de la quinurenina puede interpretarse preferentemente junto con otros parámetros clínicos. La presente invención contribuye sustancialmente al valor pronóstico del diagnóstico. Muy a menudo, el método de la presente invención se puede mejorar mediante la comparación del valor de quinurenina medido en el paciente a diagnosticar con el valor promedio obtenido de una cohorte comparable de personas que no padecen esta enfermedad.

50 Los kits para realizar el método *in vitro* como se divulga en el presente documento pueden basarse en diferentes principios. Uno de los principios preferidos se conoce como ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral. Dicho ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral puede realizarse fácilmente por el paciente sin la ayuda de un médico u otra persona con capacitación médica.

55 Las pruebas de flujo lateral también conocidas como ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral son dispositivos simples destinados a detectar la presencia (o ausencia) de una muestra de analito diana sin la necesidad de equipos especializados y costosos, aunque existen muchas aplicaciones basadas en laboratorio que son compatibles con un equipo de lectura. Normalmente, estas pruebas se utilizan para el diagnóstico médico, ya sea para pruebas en el hogar, pruebas de diagnóstico inmediato o uso en laboratorio. Una aplicación ampliamente difundida y bien conocida es la prueba de embarazo en el hogar.

60 La tecnología se basa en una serie de lechos capilares, tales como trozos de papel poroso o polímero sinterizado. Cada uno de estos elementos tiene la capacidad de transportar líquido (por ejemplo, saliva) espontáneamente. El primer elemento (la almohadilla de muestra) actúa como una esponja y retiene un exceso de líquido de muestra. Una vez empapado, el líquido migra al segundo elemento (almohadilla de conjugado) en el que el fabricante ha almacenado el llamado conjugado, un formato seco de partículas bioactivas (véase más abajo) en una matriz de sal y azúcar que contiene todo para garantizar una reacción química optimizada entre la molécula diana (por ejemplo,

quinurenina) y su compañero químico (por ejemplo, anticuerpo) que se ha inmovilizado en la superficie de la partícula. Mientras que el líquido de la muestra disuelve la matriz de sal y azúcar, también disuelve las partículas y en una acción de transporte combinada, la muestra y la mezcla conjugada fluyen a través de la estructura porosa. De esta forma, el analito se une a las partículas mientras migra más a través del tercer lecho capilar. Este material
 5 tiene una o más áreas (a menudo llamadas bandas) donde el fabricante ha inmovilizado una tercera molécula. Para cuando la mezcla muestra-conjugado alcanza estas bandas, el analito se ha unido a la partícula y la tercera molécula de 'captura' se une al complejo. Después de un tiempo, cuando más y más líquido ha pasado por las bandas, las partículas se acumulan y el área de bandas cambia de color. Normalmente, hay al menos dos bandas:
 10 una (el control) que captura cualquier partícula y, por lo tanto, muestra que las condiciones de reacción y la tecnología funcionaron bien, la segunda contiene una molécula de captura específica y solo captura aquellas partículas en las que se inmovilizó una molécula de analito. Después de pasar estas zonas de reacción, el líquido ingresa en el material poroso final, la mecha, que simplemente actúa como un envase de desechos. Las pruebas de flujo lateral pueden funcionar como ensayos competitivos o de sándwich.

15 En principio, se puede usar cualquier partícula coloreada, sin embargo, el látex (color azul) o las partículas de oro de tamaño nanométrico (color rojo) se usan más comúnmente. Las partículas de oro son de color rojo debido a la resonancia de plasmón superficial localizada. También se pueden utilizar partículas fluorescentes o magnéticas marcadas, sin embargo, estas requieren el uso de un lector electrónico para evaluar el resultado de la prueba.

20 La muestra primero encuentra partículas coloreadas que están marcadas con anticuerpos generados para el analito diana. La línea de prueba también contendrá anticuerpos contra la misma diana, aunque puede unirse a un epítipo diferente en el analito. La línea de prueba se mostrará como una banda de color en muestras positivas. Un ejemplo del ensayo de sandwich es el ELISA de sandwich.

25 Si bien no es estrictamente necesario, la mayoría de los kits de prueba incorporan preferentemente una segunda línea que contiene un anticuerpo que recoge látex/oro libre para confirmar que la prueba ha funcionado correctamente.

30 En una realización preferida, los componentes individuales del ensayo de flujo lateral se adaptan de tal manera que la presencia de quinurenina se indica solo cuando hay más de un determinado valor umbral de quinurenina en la muestra.

Un kit de prueba preferido consta de los siguientes componentes:

- 35 1. Almohadilla de muestra - se aplica una almohadilla absorbente sobre la muestra de prueba (saliva)
2. Almohadilla de conjugado o reactivo - contiene anticuerpos específicos para el analito diana (quinurenina) conjugado con partículas coloreadas (generalmente partículas de oro coloidales o microesferas de látex)
- 40 3. Membrana de reacción - normalmente una membrana hidrófoba de nitrocelulosa o acetato de celulosa sobre la cual se inmovilizan los anticuerpos antianalitos diana en una línea a través de la membrana como zona de captura o línea de prueba (también puede estar presente una zona de control, que contiene anticuerpos específicos para los anticuerpos conjugados)
- 45 4. Mecha o depósito de desechos - una almohadilla absorbente adicional diseñada para extraer la muestra a través de la membrana de reacción mediante acción capilar y recogerla.

50 Los componentes de la banda generalmente se fijan a un material de soporte inerte y se pueden presentar en un formato de tira reactiva simple o dentro de una carcasa de plástico con una toma de muestra y una ventana de reacción que muestra las zonas de captura y control.

Hay dos realizaciones preferidas de los kits de prueba (inmunoensayo de flujo lateral) utilizados en el método de la presente invención:

55 a. Ensayos sandwich de doble anticuerpo

En este formato, la muestra migra desde la almohadilla de muestra a través de la almohadilla de conjugado donde cualquier analito diana presente se unirá al conjugado. Luego, la muestra continúa migrando a través de la membrana hasta llegar a la zona de captura donde el complejo diana/conjugado se unirá a los anticuerpos inmovilizados produciendo una línea visible en la membrana. La muestra luego migra más a lo largo de la tira hasta llegar a la zona de control, donde el exceso de conjugado se unirá y producirá una segunda línea visible en la membrana. Esta línea de control indica que la muestra ha migrado a través de la membrana según lo previsto. Dos líneas claras en la membrana muestran un resultado positivo. Una sola línea en la zona de control es un resultado negativo. Los ensayos sandwich de doble anticuerpo son más adecuados para análisis más grandes, tales como patógenos bacterianos y virus, con múltiples sitios antigénicos. Para la presente invención, se debe seleccionar un par adecuado de anticuerpos que se unan a diferentes epítipos en la quinurenina.

60

65

5 Cuando los métodos o kits de prueba adecuados para realizar dicho método usan anticuerpos que se unen específicamente a la quinurenina, el término "anticuerpo" significa no solo anticuerpos producidos artificialmente, por ejemplo, mediante inmunización de un animal de laboratorio como conejo, oveja o cabra. También comprende, en una realización preferida, anticuerpos monoclonales producidos de acuerdo con la tecnología de hibridoma. Además, el término "anticuerpo" comprende también fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno tales como fragmentos de unión a antígeno producidos de manera recombinante. Dichas construcciones se pueden producir mediante exhibición de fagos y tecnologías procedentes de ellas.

10 b. Ensayos competitivos

15 Los ensayos competitivos se utilizan principalmente para probar moléculas pequeñas y difieren del formato sandwich de doble anticuerpo en que la almohadilla de conjugado contiene anticuerpos que ya están unidos al analito diana o a un análogo del mismo. Si el analito diana está presente en la muestra, no se unirá, por lo tanto, al conjugado y permanecerá sin marcar. A medida que la muestra migra a lo largo de la membrana y alcanza la zona de captura, un exceso de analito no marcado se unirá a los anticuerpos inmovilizados y bloqueará la captura del conjugado, de modo que no se producirá una línea visible. El conjugado no unido se unirá luego a los anticuerpos en la zona de control produciendo una línea de control visible. Una sola línea de control en la membrana es un resultado positivo. Dos líneas visibles en las zonas de captura y control es un resultado negativo. Sin embargo, si no hay un exceso de analito diana no marcado, se puede producir una línea débil en la zona de captura, lo que indica un resultado no concluyente. Los ensayos competitivos son más adecuados para analizar moléculas pequeñas, tales como micotoxinas, que no pueden unirse a más de un anticuerpo simultáneamente. Hay una serie de variaciones en la tecnología de flujo lateral. La zona de captura en la membrana puede contener enzimas o antígenos inmovilizados, dependiendo del analito diana, en lugar de anticuerpos. También es posible aplicar múltiples zonas de captura para crear una prueba múltiple.

20 Los inmunoensayos de flujo lateral son fáciles de usar por operadores no entrenados y generalmente producen un resultado en 15 minutos. Son muy estables y robustos, tienen una larga vida útil y generalmente no requieren refrigeración. También son relativamente baratos de producir. Estas características los hacen ideales para usar en el diagnóstico inmediato y para analizar muestras en el exterior, así como en el laboratorio. Sin embargo, su sensibilidad es limitada sin concentración adicional o procedimientos de cultivo. Hay pruebas cuantitativas disponibles, pero el presente objetivo es una prueba cualitativa para la saliva dentro de un determinado intervalo. Por lo tanto, el kit de prueba preferido se ajusta para medir la quinurenina solo si está presente por encima de una determinada concentración. Por debajo de dicha concentración, el kit de prueba mostrará un resultado negativo.

30 El método de la presente invención se realiza con saliva. La saliva es un líquido biológico clínicamente informativo que es útil para enfoques novedosos de pronóstico, diagnóstico clínico o de laboratorio, y para el control y manejo de pacientes. La saliva contiene múltiples biomarcadores y se puede encontrar una descripción general de los principios de la secreción de la glándula salival, los métodos de recolección y la discusión de usos generales en un informe de una reunión publicada en *Annals of the New York Academy of Sciences* Malamud D, Niedbala RS Oral-based diagnostics NY Acad Sci 2007; Boston Mass.

35 Recientemente, debido a la combinación de biotecnologías emergentes y diagnósticos salivales, se revela gradualmente una gran cantidad de analitos médicamente valiosos en la saliva y algunos de ellos representan biomarcadores para diferentes enfermedades (cáncer, enfermedades víricas, VIH).

Estos desarrollos han ampliado la gama de diagnósticos basados en saliva desde la simple cavidad oral hasta todo el sistema fisiológico.

40 El método de la presente invención cumple el objetivo de proporcionar una prueba que sea indolora, económica, más fácil y más segura que los enfoques basados en suero u orina con un impacto de diagnóstico molecular. En una realización, el método se modificó utilizando un método de secado (liofilización) con una dilución posterior para disminuir la sensibilidad a 0,2 μM . El presente método se comparó con la técnica de HPLC por la cual se encontraron resultados comparables.

45 Los resultados ya existentes son sorprendentes. Hay una diferencia significativa en suero y saliva entre pacientes trasplantados y voluntarios sanos. Asimismo, se detectó una respuesta inflamatoria en una etapa temprana (hasta 5 días) que con otros parámetros como la CRP o incluso síntomas clínicos.

50 La presente invención se ilustra mediante las figuras:

55 La Figura 1 muestra las etapas de la ruta de la degradación del triptófano y, por lo tanto, la estructura formada de quinurenina y otros intermedios. La degradación de triptófano a alanina y acetoacetato se inicia por triptófano-2,3-dioxigenasa.

60 La figura 2 es una evaluación de los valores normales de quinurenina en el suero de un control sano. No se ha

observado diferencia entre los géneros. El valor promedio de quinurenina en sueros de personas sanas es entre 2,5 y 3,0 μM de quinurenina.

5 La Figura 3 es una comparación de dos cohortes independientes de controles sanos normales de donantes de sangre. En la primera cohorte (vieja) se analizaron 174 sueros y en la segunda cohorte (nueva) se comprobaron 117 sueros de donantes de sangre. Entre ambos grupos no hubo diferencia estadística. Se ha medido casi el mismo valor.

10 La Figura 4 muestra las concentraciones de quinurenina en sueros de pacientes no trasplantados que sufrieron una infección, tal como por ejemplo, UTI (infección del tracto urinario), bronconeumonía o infecciones de heridas mayores. No hubo diferencia de género y una diferencia significativa para los pacientes trasplantados estables. Los valores de quinurenina fueron sustancialmente más altos que los valores medidos en suero de pacientes normales. El valor promedio osciló entre aproximadamente 7 a 9 μM de quinurenina.

15 La Figura 5 es una comparación de los niveles de quinurenina medidos en suero y en saliva, ambos obtenidos de personas de control normales y sanas. El nivel promedio de quinurenina en la saliva de personas sanas fue de aproximadamente 0,5 - 0,7 $\mu\text{M/l}$ de quinurenina, mientras que la concentración de quinurenina en suero fue de aproximadamente 2,5 - 3,0 $\mu\text{M/l}$ de quinurenina. La concentración de quinurenina es, por lo tanto, aproximadamente 4-5 veces mayor que en la saliva cuando ambas muestras se obtienen de personas de control normales.

20 La Figura 6 muestra la estabilidad de la quinurenina después de tomar la muestra de pacientes. Es importante que la concentración de quinurenina en la muestra permanezca igual durante al menos un período sustancial de tiempo (horas). Por lo tanto, se tomaron muestras, se almacenaron y se midió la concentración de quinurenina en intervalos de tiempo de una hora. Dentro del intervalo de tiempo medido (hasta 4 horas) no se observó ningún cambio sustancial en la concentración de quinurenina.

25 La Figura 7 muestra que la determinación de la quinurenina en la saliva permite una indicación fiable de posibles problemas en pacientes después de haber recibido un trasplante. La Figura muestra como control a pacientes sin inflamación que indica un posible rechazo del trasplante. Los controles mostraron una concentración de quinurenina en la saliva de un promedio de aproximadamente 0,5 $\mu\text{M/l}$ de quinurenina. El valor de la quinurenina en la saliva de los pacientes que muestran los primeros signos de inflamación aumentó drásticamente a un valor promedio de alrededor de 7 $\mu\text{M/l}$ de quinurenina. Sorprendentemente, la respuesta inflamatoria se detectó 5 días antes de que ocurriera cualquier síntoma clínico. Esto permitió el tratamiento de dichos pacientes en una etapa temprana, por lo que se pudo evitar el rechazo del trasplante.

30 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que, sin embargo, no limitan el alcance de la presente invención.

35 Ejemplo 1

40 Prueba de quinurenina para el diagnóstico de inflamación, especialmente de episodios de rechazo en el trasplante

1.1. Técnica general utilizada de ensayo colorimétrico

45 Los metabolitos del triptófano a través de la quinurenina se pueden determinar cuantitativamente en líquidos biológicos mediante reacciones de color que se conocen desde hace muchas décadas (por ejemplo, Coppini et al., Clinical Chemistry, Vol. 5, N.º 5, 1959, págs. 391-401). En general, un método de detección mediante la formación de un producto de reacción coloreado se puede realizar mediante métodos estándar.

50 Los lectores de microplacas son instrumentos de laboratorio diseñados para detectar eventos biológicos, químicos o físicos de muestras en placas de microtitulación. Son ampliamente utilizados en investigación, descubrimiento de fármacos, validación de bioensayos, control de calidad, así como procesos de fabricación en la industria farmacéutica y biotecnológica y organizaciones académicas. Las reacciones de muestra se pueden analizar en placas de microtitulación con un formato de 6-1536 pocillos. El formato de microplaca más común utilizado en laboratorios de investigación académica o laboratorios de diagnóstico clínico es una matriz de 96 pocillos (matriz de 8 por 12) con un volumen de reacción normal entre 100 y 200 μl por pocillo. Las microplacas de mayor densidad (microplacas de 384 o 1536 pocillos) se usan normalmente para aplicaciones de detección, cuando el rendimiento (número de muestras/día procesado) y el coste/muestra del ensayo se convierten en parámetros críticos, con un volumen de ensayo normal entre 5 y 50 μl por pocillo.

60 Los modos de detección comunes para los ensayos de microplaca son absorbencia, intensidad de fluorescencia, luminiscencia, fluorescencia con resolución temporal y polarización de fluorescencia.

65 La detección de absorbencia ha estado disponible en lectores de microplacas durante más de 3 décadas, y se utiliza para ensayos tales como ensayos ELISA, cuantificación de proteínas y ácidos nucleicos o ensayos de actividad enzimática. Una fuente de luz ilumina la muestra usando una longitud de onda específica (seleccionada por un filtro

óptico o un monocromador), y un detector de luz ubicado en el otro lado del pocillo mide la cantidad de luz inicial (100 %) que se transmite a través de la muestra: la cantidad de luz transmitida normalmente estará relacionada con la concentración de la molécula de interés.

5 1.2. Descripción de la prueba

Esta prueba se desarrolló como un método modificado.

10 Se preparó un reactivo de color y también se preparó una dilución de una solución estándar de quinurenina. La reacción de color se realiza con un denominado "reactivo de Ehrlich" que da como resultado un color amarillo. Una solución que comprende un 2 % en peso de dimetilaminobenzaldehído disuelto en HCl al 20 % se designa como "reactivo de Ehrlich", sirviendo dicho reactivo colorante para la detección de grupos amino primarios, pirrol y derivados de indol también. La determinación colorimétrica de la concentración se realiza con luz monocromática. La solución estándar de quinurenina se preparó usando sulfato de L-quinurenina.

15 Se mezclaron completamente cantidades iguales de muestra con 100 µl de ácido tricloroacético (30 %). Después de la centrifugación, se midió el sobrenadante. Los absorbentes de cada muestra a 492 nm se compararon con los absorbentes a 650 nm o 690 nm de la misma muestra. Luego, los absorbentes de los controles (promedio de 5 pocillos) se restaron de los absorbentes de cada pocillo. Al preparar una curva estándar, se pudo determinar la concentración de quinurenina en cada muestra.

Ejemplo 2

25 Los valores séricos se determinaron de la siguiente manera:

En un estudio piloto, los niveles de L-quinurenina se determinaron en > 15.000 sueros de > 400 receptores de un aoinjerto renal con ciclos postoperatorios bien definidos. El nivel de quinurenina refleja el grado de activación de la IDO. Todos los receptores mostraron niveles elevados de quinurenina significativamente elevados antes del trasplante renal ($16,5 \pm 5$ nmol/ml; personas estables trasplantadas sanas: $5,3 \pm 1,2$; donantes de órganos: $6,5 \pm 5,5$ y controles normales: $2,4 \pm 0,3$; diferencias entre grupos $p < 0,001$). Los valores de quinurenina se determinaron con sueros. En receptores con injertos renales que funcionan inmediatamente, los niveles de quinurenina volvieron a la normalidad en 3-5 días. Cada función retrasada del injerto se asoció con niveles elevados de quinurenina, que también volvieron a la normalidad después del comienzo de la función del injerto (hay una activación durante la diálisis y una menor excreción a través de la orina). En receptores con injertos principalmente sin función, los niveles elevados de quinurenina preoperatoria no cambiaron. En receptores con injertos que funcionan principalmente, un desglose de la función del injerto se asoció rápidamente con una elevación significativa de los niveles de quinurenina. Estos hallazgos dan evidencia de la importancia de la actividad de la quinurenina también en el trasplante renal clínico. Un estudio extendido que incluyó a 248 receptores mostró la relevancia clínica de la actividad de la quinurenina como un parámetro predictivo para el rechazo, así como para la función a largo plazo.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para la detección temprana de una posible inflamación causada por un rechazo de un trasplante, en donde el nivel de quinurenina en la saliva se determina cuantitativamente y en donde el valor de la quinurenina medido en el paciente a diagnosticar se compara con el valor promedio obtenido de una cohorte de personas comparable que no padecen esta enfermedad, por lo el valor de la quinurenina en pacientes que muestran signos tempranos de inflamación está aumentado.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una posible inflamación es causada por el rechazo de un órgano de trasplante seleccionado del grupo que comprende hígado, páncreas, corazón, pulmón y riñón.
- 15 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la posible inflamación es causada por un trasplante seleccionado del grupo que comprende trasplantes de córnea, trasplantes de retina, trasplantes de cartílago y trasplantes de piel.
- 20 4. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la posible inflamación es causada por el rechazo de un trasplante artificial.
- 25 5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el trasplante artificial se selecciona del grupo que comprende reemplazos óseos, reemplazos de articulaciones, implantes de dientes, implantes de cartílago, implantes mamarios e implantes de pene.
6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el control de la recuperación de un paciente después de haber recibido un trasplante.
7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la determinación de la quinurenina en saliva se usa para el control de la terapia.

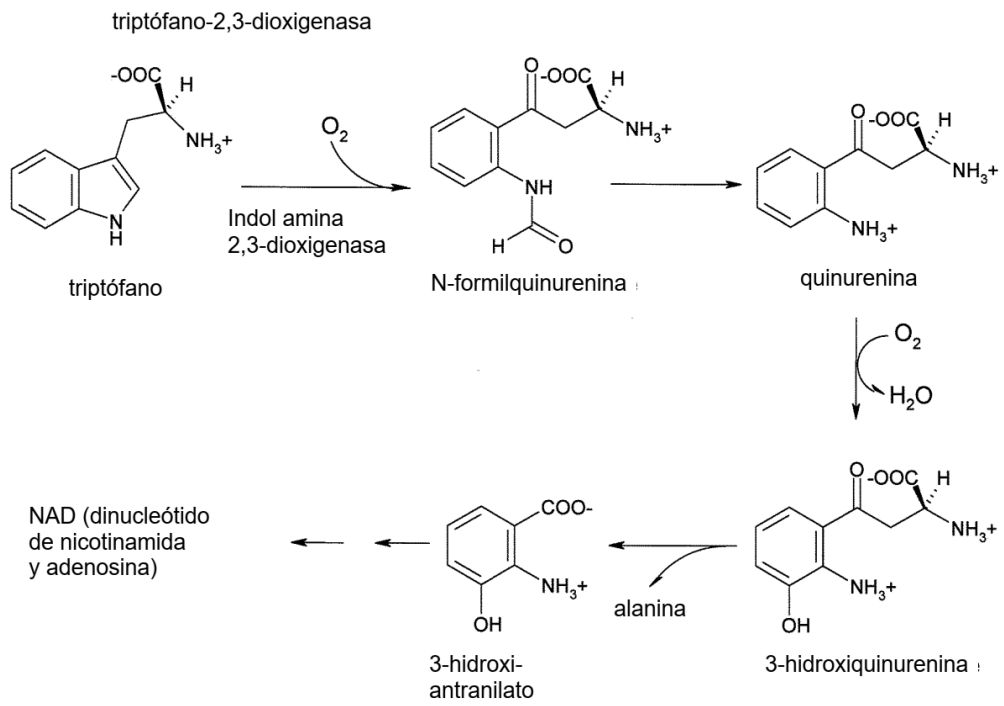
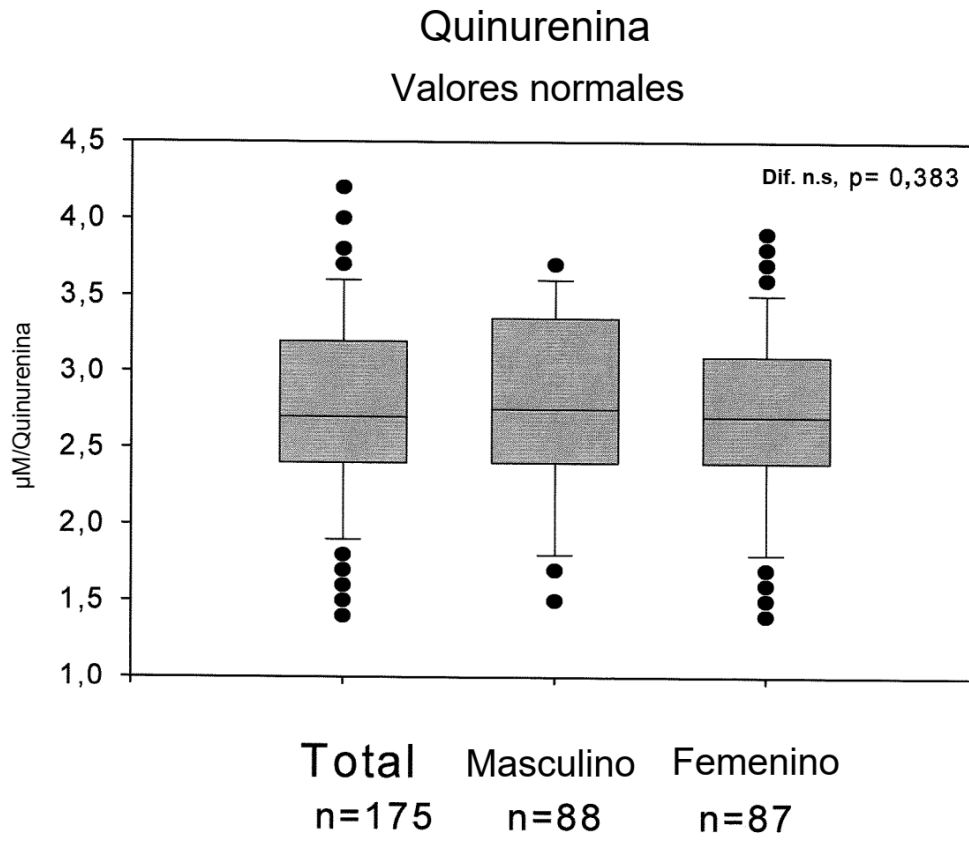


Fig. 1

Fig. 2



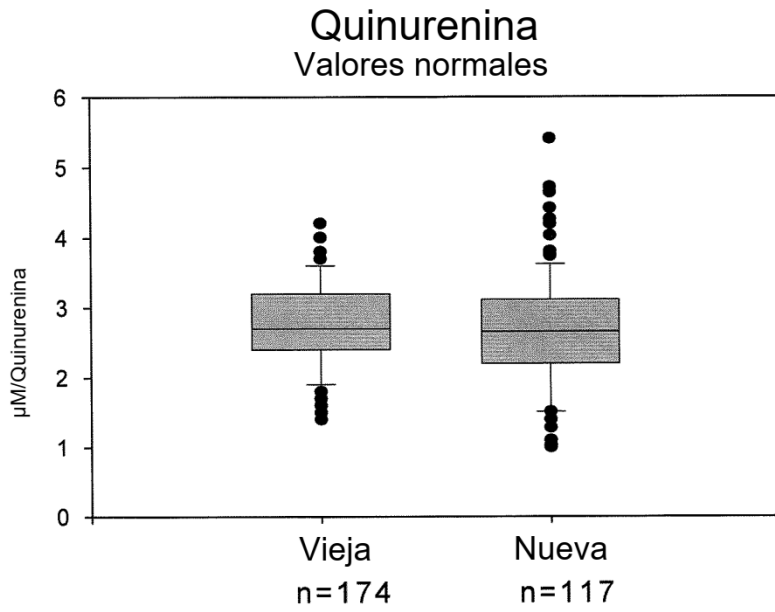


Fig. 3

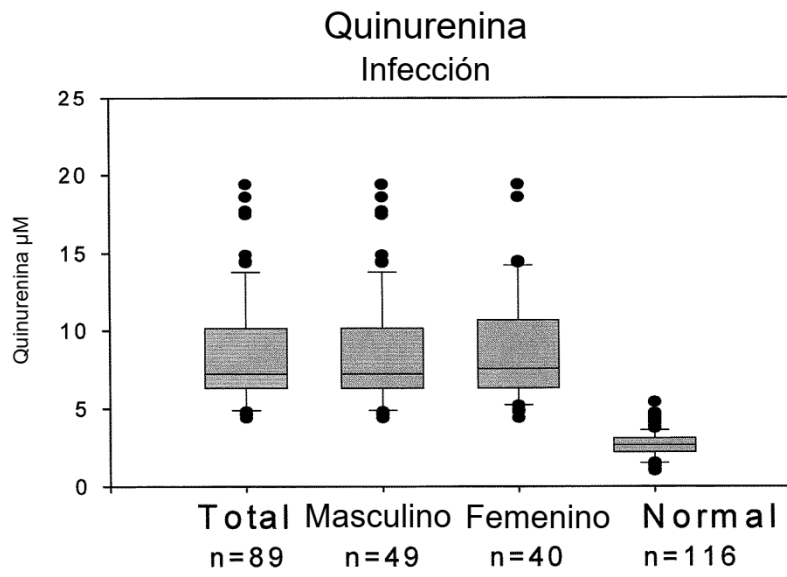


Fig.4

Valores de referencia de quinurenina en controles normales
Suero frente a saliva n = 117

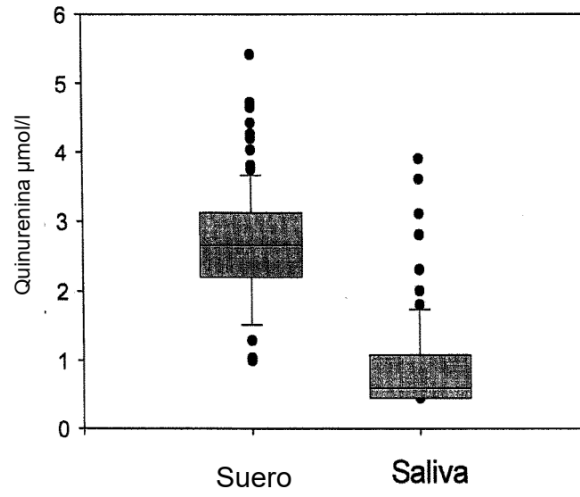


Fig. 5: Comparación entre los niveles de quinurenina en suero y saliva. Los resultados del suero son casi 4 veces más altos en los controles normales

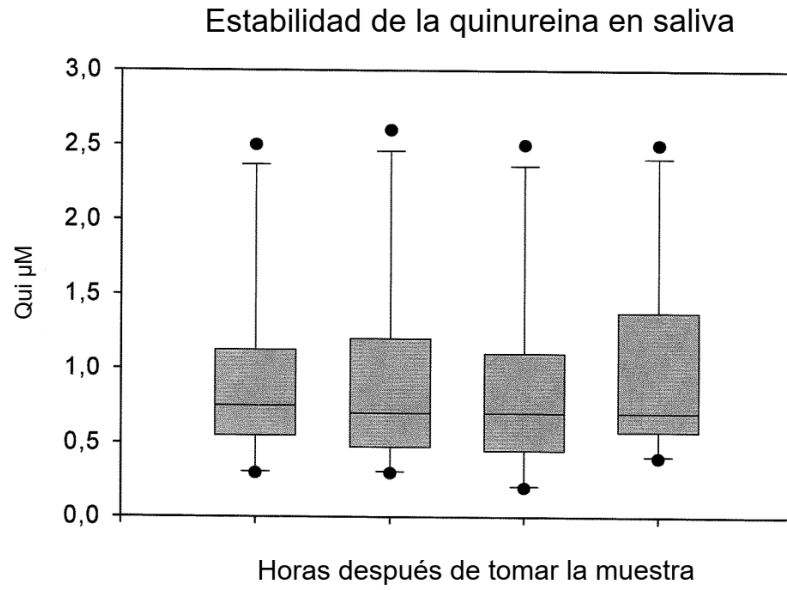


Fig.6:

Estabilidad de la quinureina después de tomar la muestra. No se encontró ningún aumento/disminución del metabolito durante un período de 4 horas, lo cual es mucho más que fiable para la prueba

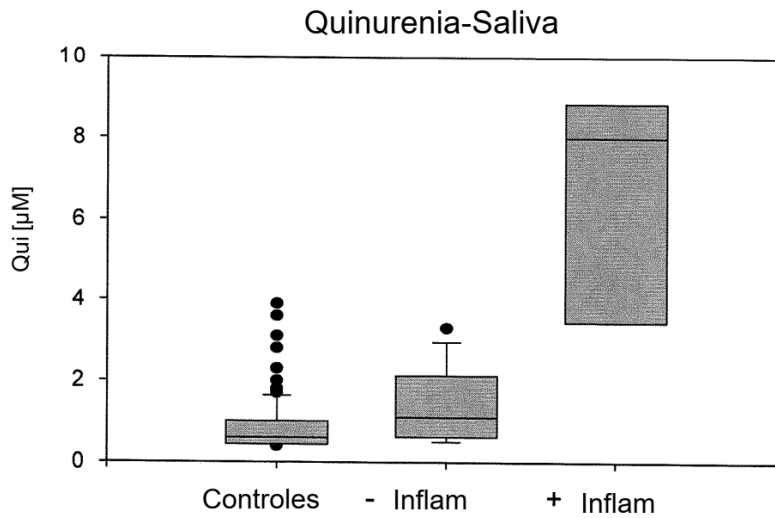


Fig.7:

Identificación de inflamación en 6 pacientes (+ Inflamación) frente a 12 pacientes sin inflamación. Hay una diferencia significativa ($p < 0,004$). La respuesta inflamatoria se detectó 5 días (media) antes de que ocurriera cualquier síndrome clínico