



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 329 541**

⑤1 Int. Cl.:
C12Q 1/34 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **00911070 .1**

⑨6 Fecha de presentación : **17.03.2000**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1163361**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2001**

⑤4 Título: **Prueba de diagnóstico.**

③0 Prioridad: **17.03.1999 GB 9906140**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.11.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.11.2009

⑦3 Titular/es: **The University of Bristol
Senate House, Tyndall Avenue
Clifton, Bristol BS8 1TH, GB**

⑦2 Inventor/es: **Millar, Michael y
Corfield, Tony**

⑦4 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 329 541 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

Prueba de diagnóstico.

5 Esta invención está relacionada con un método para la detección de vaginosis bacteriana. Se expone también un dispositivo para su uso en dicho método y un conjunto que comprende dicho dispositivo.

10 La vaginosis bacteriana (VB) es un estado en el cual la mayor parte de los numerosos microorganismos que pueblan la vagina (*Lactobacilli*) son desplazados por otro microorganismo tal como la *Gardnerella vaginalis*. La VB está asociada con el parto pretérmino (PPT). El mecanismo responsable de esta asociación se piensa a que es debido a la flora relacionada con la VB que consigue el acceso al útero y que provoca la liberación de mediadores de inflamatorios que inician el parto.

15 Se había pensado previamente que en la VB, la infección bacteriana en sí misma daba lugar al PPT. Los antibióticos se han utilizado comúnmente para el tratamiento de la VB, por ejemplo para prevenir el PPT, pero dicho tratamiento obtiene rara vez el éxito. Además, los antibióticos pueden eliminar las bacterias no patógenas, incluyendo las cepas beneficiosas tales como el *Lactobacilli*.

20 En el momento actual, la presencia de la VB se detecta sobre la base de un examen clínico y por la tinción de Gram por la característica de las bacterias de la enfermedad. Se requieren unos pocos días con el fin de conseguir un resultado, utilizando la tinción de Gram, de forma que no se puede informar al paciente del resultado en el instante de la visita a la clínica.

25 Durante el embarazo, no existe ninguna barrera membranosa entre la vagina y el útero para poder prevenir una infección bacteriana ascendente. No obstante, el tapón de moco cervical se cree que actúa como una barrera física en la infección intra-útero.

30 El tapón de moco está construido sobre una infraestructura de glicoproteínas ricas en carbohidratos, denominadas mucinas. Las mucinas están compuestas por cadenas laterales de oligosacáridos unidas a un núcleo central de proteínas. Los residuos del ácido siálico están presentes en los extremos terminales de las cadenas laterales del carbohidrato.

35 Los altos niveles de la actividad de la sialidasa bacteriana se han encontrado en las secreciones de la vagina de las mujeres con VB, en oposición a las mujeres sin VB (MacGregor y otros (1994) Am. J. Obstet. Gynaecol. 170 1048-1060; Briselden y otros (1992) J. Clin. Microbiol. 30 663-666).

40 Las sialidasas bacterianas son enzimas que se unen a los residuos del ácido siálico de los glicolípidos y glicoproteínas. Hasta la fecha actual, la actividad de la sialidasa se ha ensayado por técnicas de colorimetría, fluorimetría, y técnicas radioactivas utilizando una amplia variedad de sustratos sialoglicoconjugados sintéticos. Los sustratos que se han utilizado previamente en los ensayos de la actividad de la sialidasa incluyen: mucina de la glándula submandibular bovina y glicoproteína ácida α -1 humana (Howe y otros (1999) en prensa); ácido 2'-(4-metil-umbeliferilo)- α -D-N-acetilo neuramínico (Paupermpoonsiri y otros (1996) Clin. Inf. Dis. Vol. 23 748-752; Briselden y otros (1992) *supra*) Moncla y otros (1989) J. Clin. Microbiol, 27, 182-184; ácido 4-nitrofenilo- α sialico, y ácido 2-(3-metoxifenilo)-N-acetilo-D neuramínico (MacGregor y otros (1994) *supra*). La sensibilidad de muchos de los sustratos de sialidasa conocidos es baja.

45 Los sustratos de sialidasa descritos hasta la fecha se utilizan en una amplia variedad de ensayos. Por ejemplo, pueden utilizarse ensayos de colorimetría o fluorimétricos con sustratos sintéticos, los cuales detectan la fracción no siálica del sustrato (por ejemplo, 4-metil umbeliferona ó 4-nitrofenol). Alternativamente, la cantidad de ácido siálico liberado a partir de un sustrato sialoglicoconjugado puede ser detectada por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución y preparativo o un ensayo de colorimetría. Así mismo, los ensayos radioactivos se utilizan algunas veces, lo cual incluye la introducción de un radiomarcaje dentro del sustrato sialoconjugado y la detección del ácido siálico liberado por el cómputo de centelleo líquido. Se ha descrito en el documento JP5339283 un método para preparar ácido 4-cloro-3-indoilo α -D-N-acetilo neuramínico, para su utilización en la recuperación de la enzima similar a la sialidasa.

55 Los presentes inventores han descubierto que la conexión entre PPT y VB es debido a la actividad de la sialidasa bacteriana, más bien que a la propia infección bacteriana. Se cree que la actividad de la sialidasa está incluida en la degradación del tapón de moco, lo cual da lugar a un acceso bacteriano en incremento dentro del tracto reproductor superior.

60 Los grupos carboxílicos de los ácidos siálicos en los extremos de las cadenas laterales de los carbohidratos de las moléculas de mucina confieren una carga iónica negativa, provocando rigidez en las cadenas laterales de azúcar. La unión del ácido siálico destruye la carga mutuamente repelente entre las moléculas de mucina, provocando una pérdida de viscosidad del tapón de moco. El acceso bacteriano al interior del tracto reproductor superior se incrementa como resultado de esta acción por dos razones. En primer lugar, la mucina y por tanto la organización de la matriz del moco se pierde después de la degradación, y las propiedades mecánicas y bacterioestáticas de la matriz del moco se convierten en menos efectivas como mecanismos de barrera. En segundo lugar, la desintegración de la capa del moco facilita la adherencia bacteriana al epitelio subyacente, lo cual altera las respuestas del reconocimiento inmunológico, y reduce la probabilidad de que las bacterias puedan ser lavadas y eliminadas por el movimiento del fluido vaginal.

Se deduce de este descubrimiento que los inhibidores de sialidasa tienen que ser útiles para tratar y prevenir condiciones tales como la vaginosis bacteriana, y serán útiles en terapias para prevenir PPT. Se deduce también que los ensayos de la actividad de la sialidasa serán útiles para detectar enfermedades tales como la VB.

5 Los presentes inventores han desarrollado un ensayo de diagnóstico para enfermedades tales como la VB, que detecta la presencia de actividad de la sialidasa. Un resultado de este ensayo ha encontrado la correlación significativa con la incidencia de VB utilizando la diagnosis convencional de la tinción de Gram. El método del ensayo incluye la toma de una muestra en el paciente y poner en contacto la muestra con el sustrato de sialidasa. Después de la incubación, se observa un cambio detectable tal como un cambio del color en caso de detectar la actividad de la
10 sialidasa. En una realización preferida, el ensayo es un ensayo rápido (o test spot), es decir que la muestra se aplica al sustrato de sialidasa, el cual está soportado en sí por un medio sólido adecuado, tal como un papel de filtro.

El ensayo hace uso de sustratos en los que se ha encontrado una sensibilidad muy alta en la detección de la VB, indicado posiblemente un entorno óptimo para la unión de sialidasas a partir de la flora de la VB. El sustrato preferido
15 utilizado en el presente ensayo es una sal de ácido neuramínico 5-bromo-4-cloro-3-indoilo α -D-N-acetilo, en particular el ciclohexilamina (X- α -NANA), que se encuentra disponible a través de Rose Scientific Ltd., Edmonton, Canadá.

El método del ensayo de la presente invención para detectar la actividad de la sialidasa es altamente sensible, de bajo costo de ejecución rápido y sencillo de utilizar. El ensayo es especialmente útil para la prueba de la actividad
20 de la sialidasa como un indicador de la VB, y por tanto un predictor de la probabilidad de nacimiento pretérmino. El ensayo puede llevarse a cabo en la misma sala del paciente o bien una clínica general o de cirugía menor, puesto que el método de la invención no requiere el uso de unidades de equipamiento costoso o bien materiales distintos a los que están disponibles normalmente. Por ejemplo, en contraste con los métodos convencionales, no hay necesidad de un equipo de tinción de Gram o bien un microscopio básico. Además de ello, el método de la invención exige menos
25 trabajo que una tinción de Gram.

Así mismo, el ensayo rápido (spot) de sialidasa tiene una ventaja sobre las pruebas de colorimetría, fluorimetría o radioactividad, las cuales se utilizan normalmente para detectar la VB porque puesto que la actividad de la sialidasa
30 no está siempre presente en la orina de la VB o bien toda la flora de la VB, su presencia puede ser un indicador de que el estado es más perjudicial para el huésped en algunos casos que en otros.

De acuerdo con esta invención, se proporciona un método para la detección de la VB que comprende los pasos siguientes:

35 (i) aplicar una muestra biológica de un sujeto humano en el sustrato de sialidasa del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoilo α -D-N-acetilo neuramínico, o bien una sal del mismo (por ejemplo, la sal de ciclohexil amina), el cual se haya inmovilizado sobre un medio de soporte sólido; y

40 (ii) detectar un cambio de color en el sustrato de sialidasa inmovilizado.

Se expone aquí también un dispositivo para su utilización en la detección de la VB, cuyo dispositivo comprende el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoilo α -D-N-acetilo neuramínico, o una sal del mismo inmovilizado sobre un medio sólido.

El dispositivo puede ser utilizado en un método de la presente invención, cuyo método comprende las etapas
45 siguientes:

(i) aplicar una muestra biológica obtenida de un sujeto humano en el dispositivo; y

50 (ii) detectar la presencia o ausencia de un cambio del color en el ácido inmovilizado 5-bromo-4-cloro-3-indoilo α -D-N-acetilo neuramínico, o una sal del mismo (por ejemplo la sal de ciclohexil amina).

Se expone aquí también un conjunto de componentes para la diagnosis de la VB, que comprende un dispositivo para su uso en la detección de la VB tal como se ha descrito anteriormente.

55 Este conjunto de componentes puede comprender un medio de incubación, por ejemplo una solución tampón Tris/HCl y/o unos medios de obtención de muestras.

El medio sólido puede ser, por ejemplo, un papel de filtro.

60 Preferiblemente, el sujeto mamífero es una mujer embarazada o bien una mujer que está a la espera del embarazo.

El reactivo del ensayo puede comprender, por ejemplo, un medio de fase sólida, líquida o un gel, en donde se encuentra soportado el ácido neuramínico 5-bromo-4-cloro-3-indoilo α -D-N-acetilo o una sal del mismo, aplicado, absorbido o bien contenido de otra forma.

65 El ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoilo α -D-N-acetilo neuramínico es preferiblemente de la forma de la sal ciclohexilamina. Preferiblemente, el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoilo α -D-N-acetilo neuramínico ciclohexil amina está soportado o absorbido sobre un sustrato sólido, por ejemplo un papel de filtro. De esta forma, el compuesto reactivo puede estar

inmovilizado sobre el sustrato, para facilitar la realización del ensayo del diagnóstico. Dicho ensayo del diagnóstico en donde el compuesto reactivo es absorbido sobre un medio sólido se denomina con frecuencia como un ensayo de tipo mancha, puesto que el ensayo del diagnóstico en sí se realiza por el “manchado” de la muestra (sobre un extracto de la muestra), sobre el medio sólido en la zona en donde se haya absorbido el compuesto reactivo.

La muestra puede obtenerse directamente a partir de un sujeto mamífero, típicamente un sujeto humano, por ejemplo como un tampón de algodón, o un lavado utilizando un tampón adecuado. Después de haber tomado la muestra, puede aplicarse o ponerla en contacto directamente con el reactivo del ensayo. Alternativamente, por ejemplo cuando la muestra es un tampón de algodón, los contenidos de la muestra pueden extraerse en un medio líquido, por ejemplo una solución tampón tal como un tampón de Tris/HCl, y aplicándose después al reactivo del ensayo. Esta puede ser la aplicación del método del ensayo más conveniente.

En una realización preferida, la muestra se toma como un tampón de algodón vaginal o muestra del paciente humano mujer.

El cambio en el reactivo del ensayo es un cambio de color, desde el incoloro hacia el azul. Este cambio puede ser observado visualmente, o bien puede llevarse a cabo utilizando un equipamiento adecuado, tal como un colorímetro de pruebas de tira, o bien un espectrofotómetro, el cual podría utilizarse para cuantificar el resultado. Se prefiere que la parte del fondo del sustrato no tenga un color que pudiera oscurecer o enmascarar el cambio de color en el compuesto del reactivo.

El dispositivo utilizado en la invención puede tener la forma de un medio sólido sobre el cual esté soportado o absorbido el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoyl α -D-N-acetilo neuramínico o sal del mismo, por ejemplo el ciclohexilo amina. El reactivo de ensayo preferido es un papel de filtro impregnado en una solución de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoyl α -D-N-acetilo neuramínico y ciclohexilo amina. Preferiblemente, el papel de filtro está impregnado en una solución de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoyl α -D-N-acetilo neuramínico y ciclohexilo amina, en aproximadamente 1 mg/ml. El papel de filtro puede utilizarse directamente o bien secarse o almacenarse para un uso futuro. En consecuencia, el equipo de elementos puede comprender 5-bromo-4-cloro-3-indoyl α -D-N-acetilo ácido neuramínico ciclohexilo amina (por ejemplo en solución) y un medio sólido (por ejemplo un papel de filtro) tal que el usuario pueda aplicar el sustrato al medio sólido, o bien en donde el conjunto de elementos puede comprender un medio sólido al cual se haya aplicado y secado una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indoyl α -D-N-acetilo ácido neuramínico ciclohexilo amina.

Este conjunto de elementos puede comprender también un medio de incubación, por ejemplo una solución tampón Tris/HCl y/o unos medios de obtención de una muestra, y pudiendo empaquetarse conjuntamente en un envase adecuado con las instrucciones adecuadas para su utilización.

El reactivo del ensayo utilizado en la presente invención puede prepararse por un proceso en el cual el compuesto reactivo se lleva a entrar en contacto con un sólido adecuado o un medio de fase de gel, de forma que el compuesto reactivo esté contenido o soportado o absorbido en el medio. Por ejemplo, el compuesto reactivo puede ser preparado en una solución adecuada, la cual se aplica entonces al medio sólido.

El reactivo del ensayo puede aplicarse a una superficie de un sustrato sólido, para formar un parche local que es donde se realizará el ensayo del diagnóstico.

Preferiblemente el sujeto mamífero es una mujer embarazada o bien una mujer que esté valorando quedarse embarazada.

La presente invención puede ser utilizada en un método para diagnosticar PPT en un sujeto humano, cuyo método comprende la etapa de ensayo de la actividad de la sialidasa bacteriana en el paciente o en una muestra tomada del paciente.

Para una mejor comprensión de la presente invención, y para mostrar la forma en que la misma puede entrar en efecto, se hace referencia a continuación, a modo de ejemplo, al ejemplo siguiente.

Ejemplo

Ensayo paralelo de tinción Gram y prueba de mancha (spot) de sialidasa para el diagnóstico de la VB

100 mujeres en consulta en la Clínica Genito Urinaria de Milne, Hospital de Bristol Royal, fueron sometidas a pruebas de la actividad de sialidasa adicionalmente a la rutina de tinción de Gram para la detección de la VB. Se tomó una compresa por separado en el instante del examen, y se colocó inmediatamente en una solución tampón compuesta por 2 mls 25 mM Tris/HCl/Tween 20 (ph 7,0). Las compresas se colocaron en un almacenamiento frío a 4°C hasta el final del examen clínico.

El ácido del sustrato de ácido sialico 5-Bromo-4-cloro-3-indoyl- α -D-N-acetiloneuramínico y la sal de ciclohexilamina se pesaron hasta una concentración de 1 mg/ml en una solución tampón de 25 mM CaCl₂, 150 M Na acetato y 1 M NaCl (ph 5,5). Esto se mezcló debidamente y se trasladó con pipeta sobre una pieza de 10 cm de diámetro de papel de filtro, hasta que el papel de filtro quedara humedecido. Las compresas se retiraron de la solución Tris y se frotaron

sobre el papel de filtro inoculado con el sustrato. El papel de filtro se colocó en un disco de Petri, cerrándose la tapa y el disco incubado durante 1 hora a 37°C. Apareció una mancha azul indicando que estaba presente la actividad de la sialidasa. En caso de no existir ninguna actividad de la sialidasa, el papel permanecería sin color incluso después de un periodo de 2 horas con antelación al secado del papel de filtro.

La diagnosis del test de Gram de VB se valoró por los criterios de Spiegel (1980). El grado 2 VB según lo definido por Hay y otros (1992) es una categoría problemática, cuya relación tanto con la VB como con la flora vaginal “normal” requiere una aclaración adicional. Esta categoría no cumple con la definición de la VB, y no está claro si el Grado 2 VB es una indicación de que la colonización con los microorganismos de la VB desarrollan una progresión ascendente. En este estudio, por tanto, los Grados 1 y 2 forman un conjunto común para los fines del análisis estadístico, aunque la valoración inicial de las tinciones de Gram los divide en el Grado 1 (predominantemente Lactobacilus morfo-tipos, Grado 2 (mezclados los Lactobacilus y los organismos asociados con la VB), y Grado 3 (pocos o ningún Lactobacilli, organismos VB predominantes con la presencia de células de indicio). Los observadores fueron ciegos a los resultados del ensayo de tipo mancha, y los observadores del ensayo spot fueron ciegos a los resultados de la tinción Gram.

Resultados

Los resultados de la tinción Gram para la VB fueron correlacionados con los resultados del ensayo mancha. Los resultados de Grado 1 y Grado 2 fueron conjuntados en forma común para los análisis estadísticos, ya que el Grado 2 no se consideró como una diagnosis definitivo de la VB, y las cifras numéricas en este estudio fueron relativamente pequeñas.

Los rangos de las edades de los pacientes fueron de 16 años a 52 años con una edad media de 28,3 años, una mediana de 26 años y la moda de 25 años.

Un ensayo mancha positivo de la actividad de la sialidasa se correlacionó significativamente con la incidencia del Grado 3 de la VB en el diagnóstico de la tinción Gram al nivel de $p < 0,000001$. La sensibilidad del ensayo mancha en la detección de la VB fue por tanto de 93,5 y la especificidad 96,3. El valor predictivo positivo fue de 95,6 y el valor predictivo negativo de 94,5. Los criterios de Amsells (1990) fueron asociados significativamente con los resultados del ensayo mancha al nivel de $p = 0,04$, con una sensibilidad de 93,7, especificidad de 70,5, un valor predictivo positivo de 57,6 y un valor negativo de 96,2.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de la vaginosis bacteriana, que comprende las etapas siguientes:

- 5 (i) aplicar una muestra biológica obtenida de un sujeto humano en el sustrato de sialidasa del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoyl α -D-N-acetil neuramínico, o bien una sal del mismo, el cual se haya inmovilizado sobre un medio de soporte sólido; y
- 10 (ii) detectar un cambio en el sustrato de sialidasa inmovilizado.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cambio detectado es un cambio del color desde el tono incoloro al azul, el cual se detecta utilizando un colorímetro de tira o un espectrofotómetro.

15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el medio de soporte sólido es un papel de filtro.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la muestra es una compresa de algodón o un lavado.

20 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la muestra es una compresa y en donde los contenidos de la compresa se extraen en un medio líquido antes de contactar con el reactivo del ensayo.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sal del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoyl α -D-N-neuramínico es una sal ciclohexilo amino.