

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 827**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2014** **E 19153222 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3499240**

54 Título: **Método in vitro para la detección precoz de un trastorno neurodegenerativo o una depresión utilizando la quinurenina como un marcador**

30 Prioridad:

03.05.2013 EP 13166375

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2024

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:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 988 827 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 precoz de un trastorno neurodegenerativo o una depresión utilizando la quinurenina como un marcador

5 La presente invención se refiere al campo del diagnóstico. Los tratamientos médicos modernos afectan cada vez a más personas, ya que la medicina logró avances sustanciales en el tratamiento de las enfermedades, en particular al reemplazar partes del cuerpo u órganos mediante su sustitución por partes derivadas 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. Estos tratamientos provocan con frecuencia una respuesta del cuerpo que comienza con frecuencia con una inflamación y, finalmente, puede resultar en el rechazo del trasplante.

15 El documento EP 2 284 540 A1 describe un método para diagnosticar la insuficiencia orgánica. Este fallo puede estar relacionado con inflamación (septicemia). El método describe el uso de un perfil metabólico cuantitativo y compara los resultados con un perfil metabólico de referencia cuantitativo de una cierta cantidad de metabolitos endógenos. La idea detrás de esto parece detectar la insuficiencia orgánica debida a una infección/sepsis. En la solicitud aquí no se dice nada sobre el trasplante, el rechazo y su patrón en la saliva. El documento WO2006/105907 describe un método para diagnosticar trastornos neurológicos.

20 La presente invención describe un método para detectar y/o monitorizar un trastorno neurodegenerativo. El método describe el uso del perfil metabólico cualitativo y compara los resultados con una referencia cuantitativa. La idea subyacente parece detectar respuestas inflamatorias tempranas en el sentido de detectar la activación de la respuesta inmune innata. Esta activación es única y se encuentra en varias enfermedades, especialmente al principio. Es una reacción sobre patógenos o moléculas llamadas alarminas y está provocando la activación del inflammasoma. La siguiente etapa es la activación de la respuesta inmune adaptativa al menos 6 a 7 días después.

30 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 vías, una de las principales es la vía de la quinurenina. Esta ruta se ilustra en la Figura 1. La primera enzima de la vía, la indolamina-2,3-dioxigenasa, es fuertemente estimulada por moléculas inflamatorias, particularmente por el interferón γ . Por lo tanto, la ruta de la quinurenina a menudo se regula al alza de forma sistemática cuando se activa la respuesta inmunitaria. La importancia biológica es que el agotamiento del triptófano y la generación de quinureninas desempeñan un papel modulador clave en la respuesta inmunitaria.

35 La activación de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO 1), la principal enzima implicada en el catabolismo del triptófano, genera metabolitos inmunosupresores que contrarregulan la activación inmunitaria.

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

45 La indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), una enzima intracelular inducible por el IFN- γ , cataliza la primera etapa que limita la velocidad, de la degradación del aminoácido esencial triptófano en la vía de la quinurenina. Los efectos inmunomoduladores de la IDO están representados por la prevención de la proliferación de las células T, la promoción de la apoptosis de las células T, la inducción de la ignorancia de las células T, la anergia y la generación de células T reguladoras.

50 La presente invención proporciona un método in vitro para la detección y/o monitorización de un trastorno neurodegenerativo. En dicho método se determina el nivel de quinurenina en la saliva. Mientras que en el método de la presente invención el nivel de L-quinurenina se determina preferiblemente, sin embargo, también es posible determinar el nivel de N-formilquinurenina, 3-hidroxiquinurenina y ácido quinurenínico. Dependiendo del método de detección, puede ser posible determinar entre los diferentes intermedios. Sin embargo, también es posible utilizar pruebas de determinación que reaccionen con los diferentes productos intermedios. La determinación de la quinurenina en la saliva se realiza preferiblemente de forma cuantitativa o semicuantitativa, ya que es importante detectar cambios en el nivel de quinurenina que están fuera del intervalo normal. Es particularmente ventajoso que el método in vitro se pueda realizar sin un médico o personas con formación médica.

60 En otra realización, la presente invención proporciona kits adecuados para llevar a cabo el método según la invención. Tal kit comprende medios para la determinación de la quinurenina en la saliva. Estos medios pueden funcionar según principios diferentes. 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 preferiblemente dos anticuerpos que se unen específicamente a la quinurenina. Preferiblemente, cuando se usan dos anticuerpos, dichos anticuerpos no se unen al mismo epítipo para permitir la formación de un sándwich formado por el primer anticuerpo, la quinurenina o su derivado y el segundo anticuerpo.

65

En una realización de la presente invención, la determinación de la quinurenina o sus derivados se realiza mediante una reacción de coloración. La muestra de la prueba de determinación es la saliva. Antes de poder determinar el contenido de quinurenina o sus derivados, deben eliminarse los componentes que puedan afectar negativamente al resultado correcto y preciso del ensayo. En una realización preferida, los componentes no deseados de la saliva que pueden alterar el resultado correcto de la prueba se eliminan preferiblemente mediante la precipitación de los componentes que alteran el resultado de la medición. Dicha precipitación se puede realizar preferiblemente usando ácido tricloro. Sin embargo, es posible utilizar otros métodos para la desproteinización de la saliva además del ácido tricloro. Una vez 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 después preferiblemente con un reactivo colorante que puede ser preferiblemente el reactivo de Ehrlich. Tras el desarrollo del color, las muestras se miden midiendo la absorbancia a una longitud de onda adecuada. Preferiblemente, 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 cierto valor umbral en el kit de prueba para evitar resultados falsos positivos.

La presente invención proporciona un método *in vitro* para la detección y/o monitorización de un trastorno neurodegenerativo, en donde se determina el nivel de quinurenina en la saliva. Al comparar los valores medidos con los valores promedio obtenidos de individuos no afectados, se puede realizar una predicción diagnóstica.

En realizaciones preferidas, el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, la demencia vascular, la enfermedad de Parkinson y la disfunción cognitiva postoperatoria. Los niveles de quinurenina en la saliva se comparan con el nivel promedio de quinurenina medido en individuos comparables que no están afectados por tales enfermedades neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas progresivas crónicas, como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la demencia vascular (DV) muestran una prevalencia creciente en paralelo con el envejecimiento continuo de la población y, por lo tanto, han generado un considerable interés en la investigación reciente. A pesar de los extensos estudios sobre los antecedentes de los procesos neurodegenerativos, la base molecular exacta aún no se ha aclarado. Cada vez hay más pruebas de que la respuesta inmune innata en el cerebro está influenciada principalmente por los procesos inflamatorios.

Si bien estas enfermedades devastadoras tienen un grave impacto en la calidad de vida de los pacientes, su tratamiento suele ser un desafío. Las terapias actuales ofrecen en su mayoría solo alivio sintomático y no hay ninguna terapia neuroprotectora disponible. Los mecanismos patológicos de los diferentes trastornos neurodegenerativos comparten una serie de características comunes. La excitotoxicidad, la neuroinflamación, una alteración mitocondrial y el estrés oxidativo se han relacionado con los trastornos neurológicos agudos y crónicos.

Los procesos neurodegenerativos comparten algunas características comunes, que no son específicas de la enfermedad. Si bien aún quedan varios detalles por dilucidar, hay varios mecanismos comunes que gozan de amplia aceptación; el papel de las alteraciones mitocondriales, la excitotoxicidad, la neuroinflamación y el estrés oxidativo parece evidente.

La excitotoxicidad del glutamato se ha implicado en los mecanismos patológicos del accidente cerebrovascular isquémico, la lesión cerebral traumática y varios trastornos neurodegenerativos.

Anteriormente se pensaba que la EA implicaba una patología distinta que se puede distinguir claramente de la demencia vascular (DV). Sin embargo, en los últimos años, el papel de la disfunción cerebrovascular se ha relacionado con el proceso neurodegenerativo de la EA, y los factores de riesgo vascular han atraído una atención creciente en relación con el desarrollo y la progresión de la EA.

Hace tiempo que se reconocen las superposiciones entre la enfermedad venérea y la enfermedad de Alzheimer, pero en los últimos años se ha iniciado un cambio total de paradigma y se ha sugerido que la EA es una enfermedad principalmente vascular. Solo una pequeña proporción de los casos de EA tienen un origen genético; la mayoría es esporádica. El factor de riesgo más importante para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es la edad avanzada, y los datos de prevalencia e incidencia muestran una tendencia creciente con el aumento de la edad. Una vez más, la quinurenina desempeña un papel importante en los procesos de regulación vascular.

Del mismo modo, se ha observado una alteración del flujo sanguíneo cerebral y de la capacidad de autorregulación en modelos animales de EA, y se ha demostrado que esta alteración está asociada con el estrés oxidativo. Estos hallazgos relacionan la presencia de A β con el estrés oxidativo y la neuroinflamación. Hoy en día, bajo la nueva visión de las respuestas inmunitarias innatas, se puede suponer que existe una activación de la respuesta inflamatoria innata. Otro tema es que la quinurenina desempeña un papel importante en los procesos de regulación vascular.

El papel de la vía de la quinurenina (KP - *Kynurenine Pathway*) en la EA y otras enfermedades neurológicas, y su modulación como posible estrategia terapéutica, se explicarán con más detalle a continuación.

65

La vía de la quinurenina (KP) es la principal vía metabólica de degradación del triptófano (TRP) en los mamíferos; es responsable de más del 95 % del catabolismo del TRP en el cerebro humano. Los metabolitos producidos en esta cascada metabólica, denominados quinureninas, participan en varios procesos fisiológicos, incluidas la neurotransmisión y las respuestas inmunitarias. La KP también involucra metabolitos neurotóxicos y neuroprotectores, y se han demostrado alteraciones en su delicado equilibrio en múltiples procesos patológicos. El intermediario central de la KP es la L-quinurenina (L-KYN), en donde la vía metabólica se divide en dos ramas diferentes. La L-KYN se transforma en el ácido quinurénico (KYNA) neuroprotector o en la 3-hidroxi-L-quinurenina (3-OH-KYN), que se metaboliza posteriormente en una secuencia de etapas enzimáticas para producir finalmente NAD (*Nicotin Amide Adenosine dinucleotide* - dinucleótido de nicotinamida y adenina). Los detalles relevantes se muestran en la Figura 8.

Se han demostrado alteraciones en la KP en varios trastornos neurológicos, como la enfermedad de Huntington. Se han demostrado desequilibrios en la KP no solo en la enfermedad de Alzheimer, sino también en otros trastornos en donde existe un deterioro cognitivo, e influir en este delicado equilibrio puede tener un valor terapéutico.

Además, se ha sugerido que los cambios en los metabolitos de la quinurenina se correlacionan con el volumen del infarto, la mortalidad de los pacientes con ictus y el deterioro cognitivo posterior al ictus. En otro estudio, se midieron los niveles séricos de quinurenina y los marcadores inflamatorios en pacientes sometidos a cirugía cardíaca; los resultados indicaron una asociación de varios niveles del metabolito de la quinurenina con el rendimiento cognitivo posquirúrgico.

Los resultados muestran un aumento de los niveles de triptófano con una disminución de los niveles de quinurenina, ácido antranílico y ácido 3-hidroxiantranílico asociados con baipás, y un aumento posterior del ácido quinurénico. Los niveles de neopterinina y productos de peroxidación lipídica aumentaron después de la cirugía en pacientes sin baipás, mientras que los niveles de TNF- α y S100B aumentaron después del baipás. Los cambios en los niveles de neopterinina fueron mayores después de una cirugía sin baipás. Las pruebas cognitivas mostraron que los niveles de triptófano, quinurenina, ácido quinurénico y la relación quinurenina/triptófano se correlacionaban con aspectos de la función cognitiva postoperatoria y eran predictores significativos del rendimiento cognitivo en tareas sensibles a la función ejecutiva frontal y a la memoria. Por lo tanto, la anestesia y la cirugía mayor están asociadas con cambios inflamatorios (activación de la respuesta inmune innata según la generación de radicales libres) y alteraciones en el metabolismo oxidativo del triptófano, que predicen la función cognitiva posquirúrgica y pueden desempeñar un papel en ella.

Los metabolitos de la KP también se han implicado en el deterioro cognitivo vascular. En lo que respecta a la enfermedad de Alzheimer, hay una cantidad sustancial de pruebas que demuestran una alteración del metabolismo del triptófano.

Desde el punto de vista del metabolismo periférico de la quinurenina, se midió la disminución de los niveles de KYNA en el suero, los glóbulos rojos y el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con EA. Además, se demostró una mayor actividad de laIDO en el suero de los pacientes con EA, como lo refleja un aumento de la relación KYN/TRP, y esta elevación mostró una correlación inversa con la tasa de deterioro cognitivo. La activación de laIDO también se correlacionó con varios marcadores inmunitarios en la sangre, lo que indica una activación inmunitaria, lo que apoya aún más el papel de la neuroinflamación en el mecanismo patológico de la EA. La inmunohistoquímica también confirmó un aumento de la actividad de laIDO en el hipocampo de los pacientes con EA, junto con una mayor inmunorreactividad de la QUIN.

Una realización particularmente preferida de la presente invención es el diagnóstico y la monitorización de la disfunción cognitiva postoperatoria. La disfunción cognitiva postoperatoria (POCD - *Postoperative Cognitive Dysfunction*) se define como un nuevo trastorno funcional cognitivo desarrollado después de un procedimiento quirúrgico. Los síntomas son sutiles y muestran un patrón múltiple. Los mecanismos que conducen a esta entidad aún no están completamente resueltos. Los resultados experimentales mostraron que la respuesta inmunológica del sistema inmunitario innato conduce a una neuroinflamación. La activación de la respuesta inflamatoria y las cascadas de señales de TNF- α y NF- κ B están destruyendo la integridad de la barrera hematoencefálica mediante la excreción de diferentes citocinas.

Esto permite la migración de los macrófagos al hipocampo y permite deshabilitar la respuesta de la memoria cerebral. La respuesta antiinflamatoria podría inhibir esta acción proinflamatoria y se prohibiría la disfunción.

Se ha demostrado que la QUIN estimula la peroxidación lipídica, la producción de especies reactivas de oxígeno y la disfunción mitocondrial. Los estudios realizados en cultivos organotípicos del sistema corticoestriatal de ratas indican que las concentraciones de QUIN, incluso ligeramente superiores a las fisiológicas, pueden provocar neurodegeneración tras unas semanas de exposición. Se ha descubierto que las neuronas espinales son especialmente sensibles a las variaciones de la QUIN que provocan la muerte celular con concentraciones solo nanomolares de este metabolito.

La vía de la quinurenina (KP) metaboliza el aminoácido esencial triptófano y genera una serie de metabolitos neuroactivos denominados quinureninas. Segregados en al menos dos ramas distintas, a menudo denominadas brazos «neurotóxicos» y «neuroprotectores» de la KP, están regulados por las dos enzimas quinurenina 3-monooxigenasa y quinurenina aminotransferasa, respectivamente. Curiosamente, varias enzimas de la vía están bajo

un estricto control de los mediadores inflamatorios e incluso pequeños cambios pueden provocar lesiones graves. En los últimos años hemos visto un enorme aumento en nuestra comprensión de la neuroinflamación en la enfermedad del SNC. Existe evidencia de que la neuroinflamación está relacionada con el sistema inmunitario innato y con el papel de los inflammasomas NAPLP3. Esta podría ser una opción de enfoque terapéutico protector en este tipo de trastornos.

La participación de la activación del sistema inmunitario en la fisiopatología de ciertos trastornos psiquiátricos está bien documentada. Las moléculas inflamatorias, como las citocinas proinflamatorias, podrían mejorar la actividad de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que es la primera enzima limitante de la velocidad de la vía de degradación del triptófano, la vía de la quinurenina.

El conocimiento sobre los metabolitos de la quinurenina y su participación en los procesos neurofisiológicos ha aumentado drásticamente en los últimos años. En particular, el KYNA endógeno parece controlar estrictamente la activación de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y participar en las funciones cognitivas. Por lo tanto, se ha descubierto que la disminución de los niveles endógenos de KYNA en el cerebro de rata reduce la activación de estas neuronas, y los ratones con una delección dirigida de la quinurenina aminotransferasa II muestran niveles bajos de KYNA cerebral endógeno concomitantes con un mayor rendimiento en las pruebas cognitivas. También se sugiere que las quinureninas participan en la fisiopatología de los trastornos psiquiátricos. Por lo tanto, se han encontrado niveles elevados de KYNA en el líquido cefalorraquídeo y en el cerebro post mortem de pacientes con esquizofrenia. El estado actual de los factores genéticos y hormonales que regulan la vía de la quinurenina del metabolismo del triptófano sugiere que esta vía media los mecanismos genéticos y ambientales de la depresión. Las enzimas que limitan la velocidad de formación de quinurenina, la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) son activadas por las hormonas del estrés (TDO) y/o por las citocinas proinflamatorias (IDO). La presencia simultánea de alelos altamente productores de genes de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, el interferón gamma y el factor de necrosis tumoral alfa) determina la predisposición genética a la depresión mediante la regulación al alza de la IDO, mientras que el impacto del estrés ambiental está mediado por la activación hormonal de la TDO. La vía triptófano-quinurenina representa un importante punto de encuentro de la interacción entre los genes y el medio ambiente en la depresión y un nuevo objetivo para la intervención farmacológica. Por lo tanto, el método descrito en la presente memoria también se puede usar para el diagnóstico de la depresión.

Los métodos de diagnóstico descritos en la presente memoria deben usarse junto con los parámetros clínicos. El valor relativo de la quinurenina puede interpretarse preferiblemente 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 comparando el valor de la quinurenina medido en el paciente a diagnosticar con el valor promedio obtenido de una cohorte comparable de personas que no padecen esta enfermedad.

Los kits para realizar el método in vitro tal como se describe en la presente memoria 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 ser realizado fácilmente por el paciente sin la ayuda de un médico u otra persona con formación médica.

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 un equipo especializado y costoso, aunque existen muchas aplicaciones de laboratorio compatibles con un equipo de lectura. Por lo general, estas pruebas se utilizan para el diagnóstico médico, ya sea para pruebas en el hogar, pruebas en el lugar de atención o para uso en laboratorios. Una aplicación muy extendida y conocida es la prueba de embarazo casera.

La tecnología se basa en una serie de lechos capilares, como trozos de papel poroso o polímero sinterizado. Cada uno de estos elementos tiene la capacidad de transportar fluido (por ejemplo, saliva) de forma espontánea. El primer elemento (la almohadilla de muestra) actúa como una esponja y retiene un exceso de fluido de muestra. Una vez empapado, el fluido migra al segundo elemento (almohadilla de conjugado) en donde el fabricante ha almacenado el llamado conjugado, un formato seco de partículas bioactivas (ver más abajo) en una matriz de sal y azúcar que contiene todo lo necesario para garantizar una reacción química optimizada entre la molécula diana (por ejemplo, la quinurenina) y su pareja química (por ejemplo, el anticuerpo) que se ha inmovilizado en la superficie de la partícula. Si bien el fluido de muestra disuelve la matriz de sal y azúcar, también disuelve las partículas y, en una acción de transporte combinada, la muestra y el conjugado se mezclan mientras fluyen a través de la estructura porosa. De esta manera, el analito se une a las partículas mientras migra más a través del tercer lecho capilar. Este material tiene una o más áreas (a menudo llamadas tiras) en donde el fabricante ha inmovilizado una tercera molécula. Cuando la mezcla de muestra y conjugado llega a estas tiras, 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 fluido ha pasado por las tiras, las partículas se acumulan y el área de la tira cambia de color. Por lo general, hay al menos dos tiras: una (la de control) que captura cualquier partícula y, por lo tanto, demuestra que las condiciones de reacción y la tecnología funcionaron bien, la segunda contiene una molécula de captura específica y solo captura aquellas partículas en donde se ha inmovilizado una molécula de analito. Después de pasar por estas zonas de reacción, el fluido entra en el material poroso final, la mecha, que simplemente actúa como un contenedor de residuos. Las pruebas de flujo lateral pueden funcionar como ensayos competitivos o de tipo sándwich.

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

La muestra encuentra primero partículas coloreadas que están marcadas con anticuerpos producidos contra 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 las muestras positivas. Un ejemplo del ensayo tipo sándwich es el ELISA tipo sándwich.

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

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 cierto valor umbral de quinurenina en la muestra.

Un kit de prueba preferido consiste en los siguientes componentes:

1. Almohadilla de muestra - se aplica una almohadilla absorbente sobre la muestra de prueba (saliva)
2. Almohadilla conjugada o reactiva - contiene anticuerpos específicos contra el analito diana (quinurenina) conjugados con partículas coloreadas (normalmente partículas de oro coloidal o microesferas de látex)
3. Membrana de reacción - típicamente una membrana hidrófoba de nitrocelulosa o acetato de celulosa sobre la que los anticuerpos contra el analito diana se inmovilizan 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 contenga anticuerpos específicos para los anticuerpos conjugados)
4. Mecha o depósito de residuos: una almohadilla absorbente adicional diseñada para arrastrar la muestra a través de la membrana de reacción por acción capilar y recogerla.

Los componentes de la tira generalmente se fijan a un material de soporte inerte y pueden presentarse en un formato de varilla simple o dentro de una carcasa de plástico con un puerto de muestra y una ventana de reacción que muestran 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:

a. Ensayos tipo sándwich de anticuerpos dobles

En este formato, la muestra migra desde la almohadilla de muestra a través de la almohadilla de conjugado, en donde cualquier analito diana presente se unirá al conjugado. Luego, la muestra continúa migrando a través de la membrana hasta que alcanza la zona de captura en donde el complejo diana/conjugado se unirá a los anticuerpos inmovilizados produciendo una línea visible en la membrana. Luego, la muestra migra más a lo largo de la tira hasta llegar a la zona de control, en 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 tipo sándwich de doble anticuerpo son los más adecuados para análisis más grandes, 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 de la quinurenina.

Cuando los métodos o kits de ensayo adecuados para llevar a cabo dicho método usan anticuerpos que se unen específicamente a la quinurenina, el término «anticuerpo» significa no solo los anticuerpos producidos artificialmente, por ejemplo, mediante la inmunización de un animal de laboratorio como un conejo, una oveja o una cabra. También comprende, en una realización preferida, anticuerpos monoclonales producidos según la tecnología del hibridoma. Además, el término «anticuerpo» comprende también fragmentos de anticuerpos que se unen al antígeno, tales como los fragmentos de unión al antígeno producidos de forma recombinante. Dichas construcciones se pueden producir mediante visualización en fagos y tecnologías derivadas de la misma.

b. Ensayos competitivos

Los ensayos competitivos se utilizan principalmente para analizar moléculas pequeñas y se diferencian del formato sándwich de doble anticuerpo en que la almohadilla conjugada contiene anticuerpos que ya están unidos al analito diana o a un análogo del mismo. Si el analito diana está presente en la muestra, por lo tanto, no se unirá al conjugado

y permanecerá sin etiquetar. 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 produce ninguna línea visible. El conjugado no unido se unirá después 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 son 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 los más adecuados para analizar moléculas pequeñas, como las 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 antígenos o enzimas inmovilizados, dependiendo del analito diana, en lugar de anticuerpos. También es posible aplicar varias zonas de captura para crear una prueba multiplex.

Los inmunoensayos de flujo lateral son fáciles de usar por parte de operadores no capacitados y, por lo general, producen un resultado en 15 minutos. Son muy estables y robustos, tienen una larga vida útil y, por lo general, no requieren refrigeración. También son relativamente baratos de producir. Estas características las hacen ideales para su uso en el punto de atención y para analizar muestras en el campo, así como en el laboratorio. Sin embargo, su sensibilidad es limitada sin procedimientos adicionales de concentración o cultivo. Hay pruebas cuantitativas disponibles, pero nuestro objetivo es una prueba cualitativa para detectar la saliva dentro de un intervalo determinado. 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.

El método de la presente invención se lleva a cabo con saliva. La saliva es un fluido biológico con información clínica que es útil para enfoques novedosos del pronóstico, el diagnóstico clínico o de laboratorio y el seguimiento y el tratamiento de los pacientes. La saliva contiene múltiples biomarcadores y en el informe de una reunión publicado en los Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York (Malamud D, Niedbala RS Oral-based Diagnostics NY Acad Sci 2007) se puede encontrar una descripción general de los principios de la secreción de las glándulas salivales, los métodos de recolección y un análisis de los usos generales; Boston Mass.

Recientemente, debido a la combinación de biotecnologías emergentes y diagnósticos salivales, se están descubriendo gradualmente una gran cantidad de analitos de la saliva de valor médico, algunos de los cuales representan biomarcadores de diferentes enfermedades (cáncer, enfermedades virales, VIH).

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

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

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

Descripción de las figuras:

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

La Figura 2 es una evaluación de los valores normales de quinurenina en el suero de un control sano. No se ha observado ninguna diferencia entre los géneros. El valor medio de la quinurenina en el suero de personas sanas oscila entre 2,5 y 3,0 μM de quinurenina.

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

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

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

La Figura 6 muestra la estabilidad de la quinurenina después de tomar la muestra de los pacientes. Es importante que la concentración de quinurenina en la muestra permanezca igual durante al menos un período de tiempo sustancial (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.

La Figura 7 (no inventiva) muestra que la determinación de la quinurenina en la saliva permite una indicación fiable de los posibles problemas en los pacientes después de haber recibido un trasplante. La figura muestra como control a pacientes sin una inflamación que indique 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 mostraban los primeros signos de inflamación aumentó drásticamente hasta un valor promedio de alrededor de 7 $\mu\text{M/L}$ de quinurenina. Sorprendentemente, la respuesta inflamatoria se detectó 5 días antes de que se produjera cualquier síntoma clínico. Esto permitió el tratamiento de estos pacientes en una fase temprana, por lo que se pudo evitar el rechazo del trasplante.

La Figura 8 es una descripción esquemática de la ruta de la quinurenina, la principal vía de degradación del triptófano en eucariotas superiores. Las enzimas se indican en cursiva. Los metabolitos neurotóxicos QUIN y 3-HK están resaltados en gris y el metabolito neuroprotector KYNA en gris oscuro.

La Figura 9 es una comparación de la quinurenina (medida en plasma y en saliva) en 4 grupos: Control $n = 116$; pacientes antes de una cirugía cardíaca $n = 51$; pacientes con trastorno cerebral postoperatorio $n = 8$ y pacientes con demencia cerebral (POCD) (antes del tratamiento) $n = 9$. Hubo una diferencia significativa entre el control, la POCD y la demencia vascular (DV) ($p < 0,001$). Se encontraron resultados similares entre la cirugía cardíaca y la POCD y DV ($p < 0,05$) tanto en el plasma como en la saliva.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que, sin embargo, no limitan el alcance de la presente invención, que se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

Ejemplo 1

Reacción cromática

1.1. Técnica de ensayo colorimétrico de uso general

Los metabolitos del triptófano a través de la quinurenina pueden determinarse cuantitativamente en los fluidos biológicos mediante reacciones de color que se conocen desde hace muchas décadas (por ejemplo, Coppini y col., *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.

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

Los modos de detección comunes para los ensayos de microplacas son la absorbancia, la intensidad de la fluorescencia, la luminiscencia, la fluorescencia resuelta en el tiempo y la polarización de la fluorescencia.

La detección de absorbancia ha estado disponible en lectores de microplacas durante más de 3 décadas y se utiliza para ensayos como los ensayos ELISA, la cuantificación de proteínas y ácidos nucleicos o los ensayos de actividad enzimática. Una fuente de luz ilumina la muestra utilizando una longitud de onda específica (seleccionada por un filtro óptico o un monocromador), y un detector de luz ubicado al otro lado del pocillo mide la cantidad de luz inicial (100 %) que se transmite a través de la muestra: la cantidad de luz transmitida generalmente estará relacionada con la concentración de la molécula de interés.

1.2. Descripción de la prueba

Esta prueba se desarrolló como un método modificado.

5 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 el denominado «reactivo de Ehrlich» que da como resultado un color amarillo. Una solución que comprende un 2 % en peso de dimetilaminobenzaldehído disuelto en un 20 % de HCl se denomina «reactivo de Ehrlich». Dicho reactivo colorante sirve también para la detección de grupos amino primarios y derivados de pirrol e indol. La determinación colorimétrica de la concentración se realiza con luz monocromática. La solución estándar de quinurenina se preparó usando sulfato de L-quinurenina.

10 Se mezclaron minuciosamente cantidades iguales de muestra con 100 µl de ácido tricloroacético (30 %). Tras 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. A continuación, los absorbentes de los controles (promedio de 5 pocillos) se restaron de los absorbentes de cada pocillo. Preparando una curva estándar, se pudo determinar la concentración de quinurenina en cada muestra.

Ejemplo 2 (no forma parte de la invención)

20 Los valores séricos se determinaron de la siguiente manera:

En un estudio piloto, se determinaron los niveles de L-quinurenina en más de 15.000 sueros de más de 400 receptores de un aloinjerto renal con ciclos postoperatorios bien definidos. El nivel de quinurenina refleja el grado de activación de la IDO. Todos los receptores mostraron niveles de quinurenina significativamente elevados antes del trasplante renal ($16,5 \pm 5$ nmol/ml); personas sanas trasplantadas estables: $5,3 \pm 1,2$; donantes de órganos: $6,5 \pm 5,5$ y controles normales: $2,4 \pm 0,3$; diferencias entre grupos $p < ,001$). Los valores de quinurenina se determinaron con sueros. En los receptores con injertos renales de funcionamiento inmediato, los niveles de quinurenina volvieron a la normalidad en un plazo de 3 a 5 días. Cada retraso en la función del injerto se asoció con niveles elevados de quinurenina, que también volvieron a la normalidad tras el inicio de la función del injerto (hay una activación durante la diálisis y una menor excreción por la orina). En los receptores con injertos principalmente infuncionales, los niveles elevados de quinurenina preoperatorios no cambiaron. En los receptores con injertos principalmente funcionales, la interrupción de la función del injerto se asoció rápidamente con una elevación significativa de los niveles de quinurenina. Estos hallazgos demuestran la importancia de la actividad de la quinurenina también en el trasplante renal clínico. Un estudio extenso en donde participaron 248 receptores demostró la relevancia clínica de la actividad de la quinurenina como parámetro predictivo del rechazo y de la función a largo plazo.

Ejemplo 3

40 Ocho pacientes con trastornos cerebrales postoperatorios tras una cirugía cardíaca (reemplazo valvular, edad media de $62 \pm 6,3$ años) que cumplían los criterios (26) y nueve pacientes con demencia cerebral (edad media de $73 \pm 8,3$ años, puntuación media de MMS de 22) se inscribieron en el estudio comparativo con controles normales ($n = 116$); edad media de 48,8 años, intervalo de 12 a 88 años) y pacientes antes de una cirugía cardíaca ($n = 51$, edad media de 51,3 años, intervalo de 42 a 69 años). El objetivo era detectar la respuesta inflamatoria después de este procedimiento quirúrgico mayor mediante la estimación de la quinurenina en el plasma o en la saliva. La quinurenina fue significativamente mayor en los pacientes con POCD al quinto día del postoperatorio. Los pacientes con demencia cerebral mostraron, antes del inicio del tratamiento médico, un nivel elevado de quinurenina en el plasma y en la saliva.

En total, ya en este grupo tan reducido de pacientes se pudo demostrar que la medición de la quinurenina es una herramienta para identificar los trastornos cerebrales y para controlarlos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método in vitro para la detección y/o monitorización de un trastorno neurodegenerativo, en donde se determina el nivel de quinurenina en la saliva y en donde el nivel determinado de quinurenina se compara con el nivel promedio de quinurenina medido en individuos comparables que no están afectados por un trastorno neurodegenerativo, por lo que aumenta el valor de la quinurenina en pacientes que padecen trastornos neurodegenerativos.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en donde el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, enfermedad de Parkinson, disfunción cognitiva postoperatoria y depresión.
- 15 3. Uso de un kit para realizar el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende medios adecuados para determinar el nivel de quinurenina en la saliva, en donde se trata de un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral.
4. Uso del kit según la reivindicación 3, que comprende medios para realizar un ensayo tipo sándwich de doble anticuerpo o un ensayo competitivo.

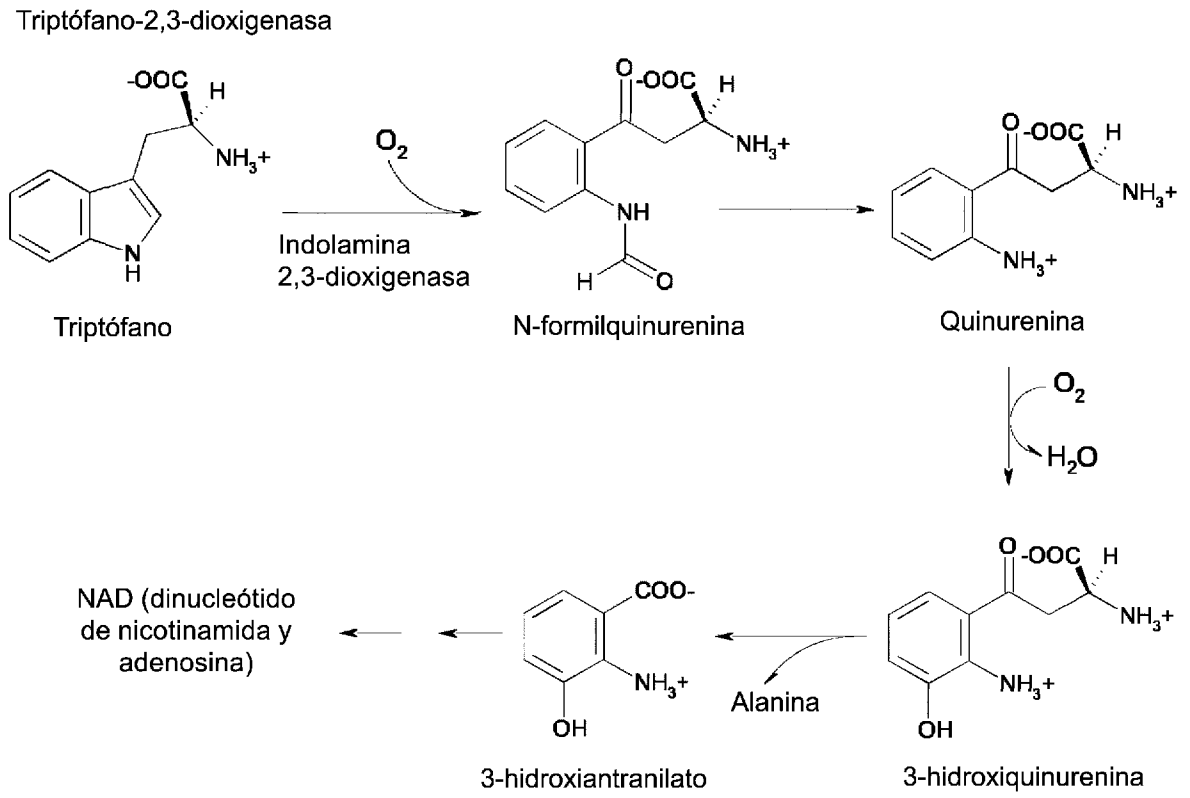


Figura 1

Valores normales de quinurenina

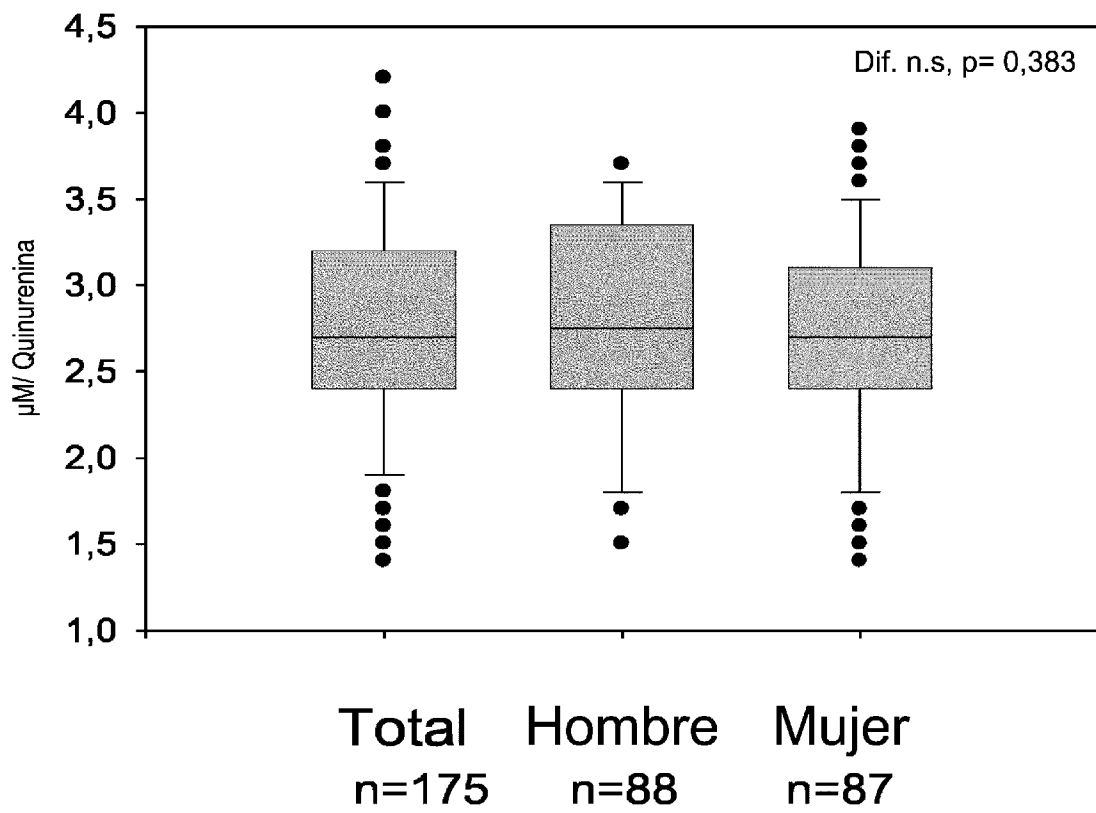


Figura 2

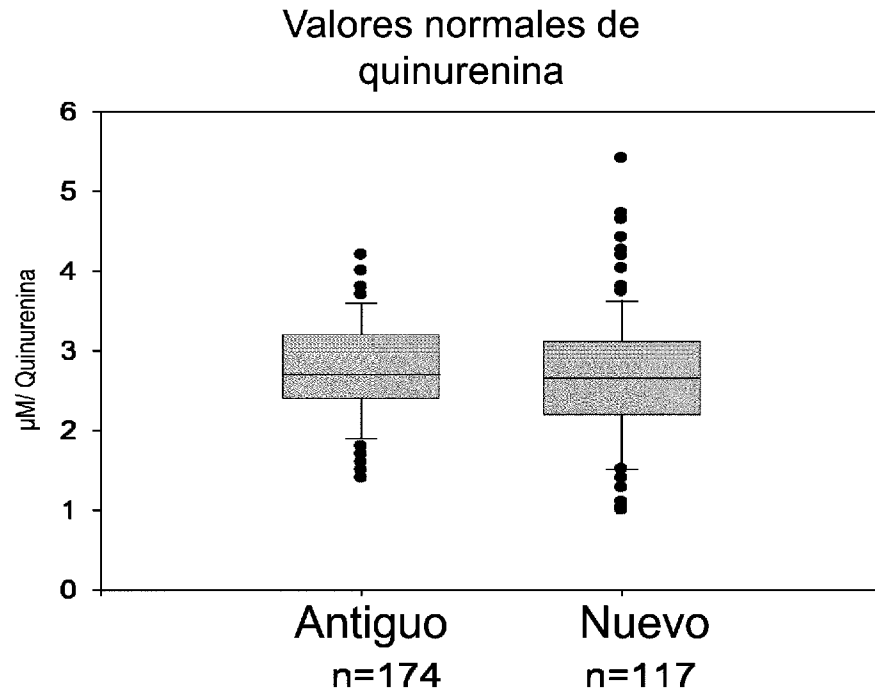


Figura 3

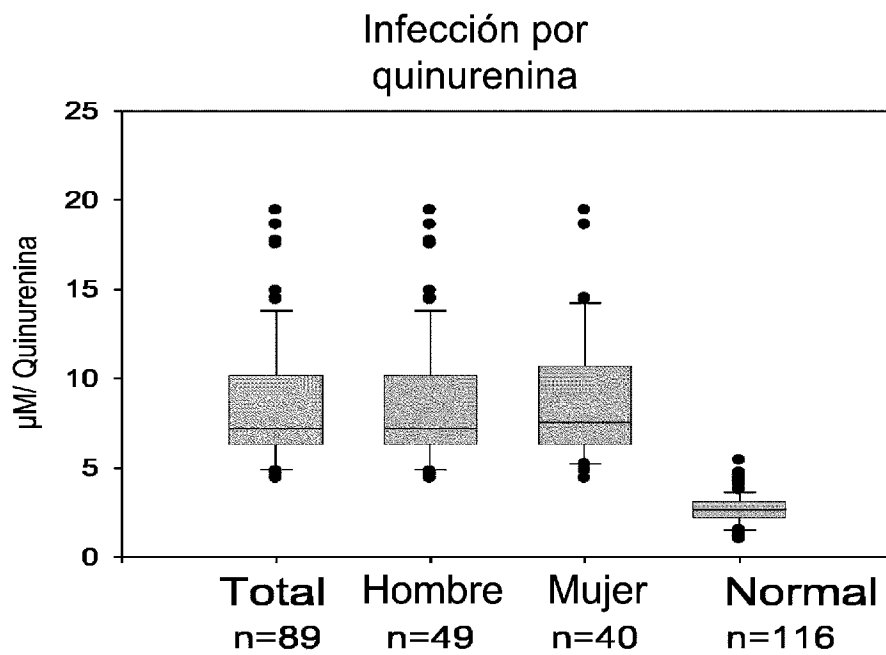


Figura 4

Valor de referencia de quinurenina en suero de controles normales vs. saliva n = 117

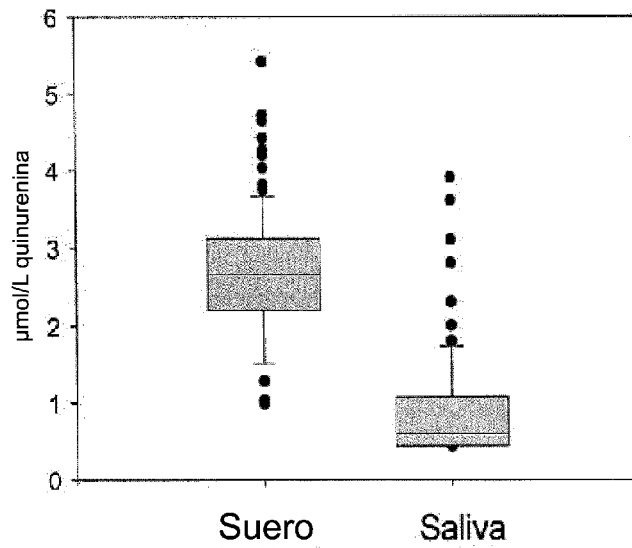


Figura 5: Comparación entre niveles séricos y salivales de quinurenina. Los resultados séricos son casi 4 veces más altos en los controles normales.

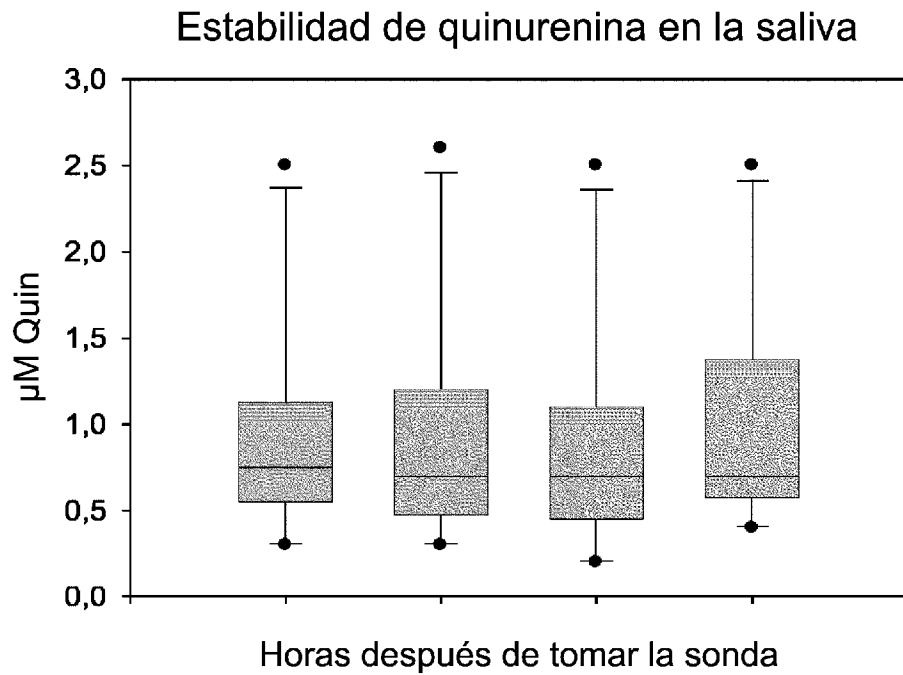


Figura 6: Estabilidad de quinurenina después de tomar la sonda. No se encontró ninguna entrada o disminución del metabolito durante un período de 4 horas, lo que es mucho más que fiable para las pruebas.

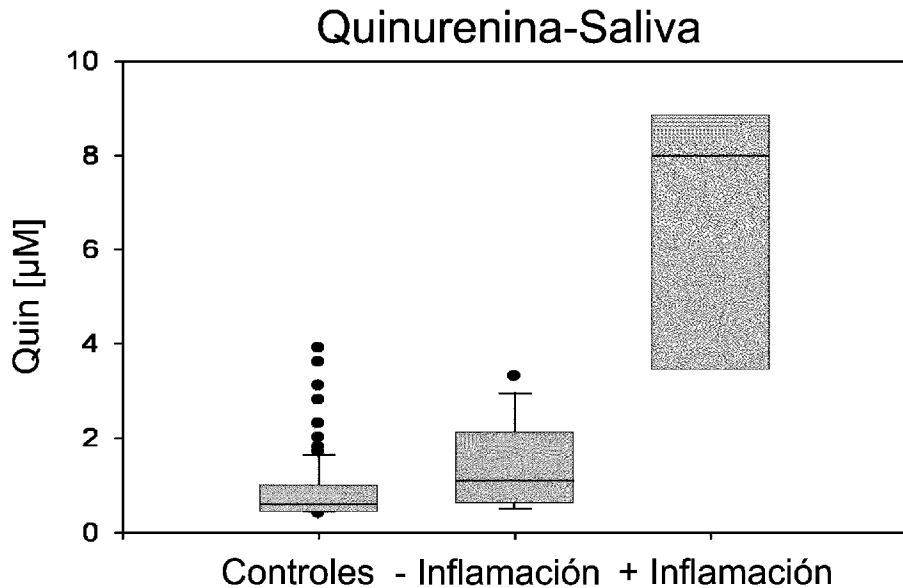


Figura 7: Identificación de inflamación en 6 pacientes (+ inflamación) vs. 12 pacientes sin inflamación. Hubo una diferencia significativa ($p < ,004$). La respuesta inflamatoria se detectó 5 días (mediana) antes de que se produjera cualquier síndrome clínico.

Metabolismo del triptófano/ quinurenina

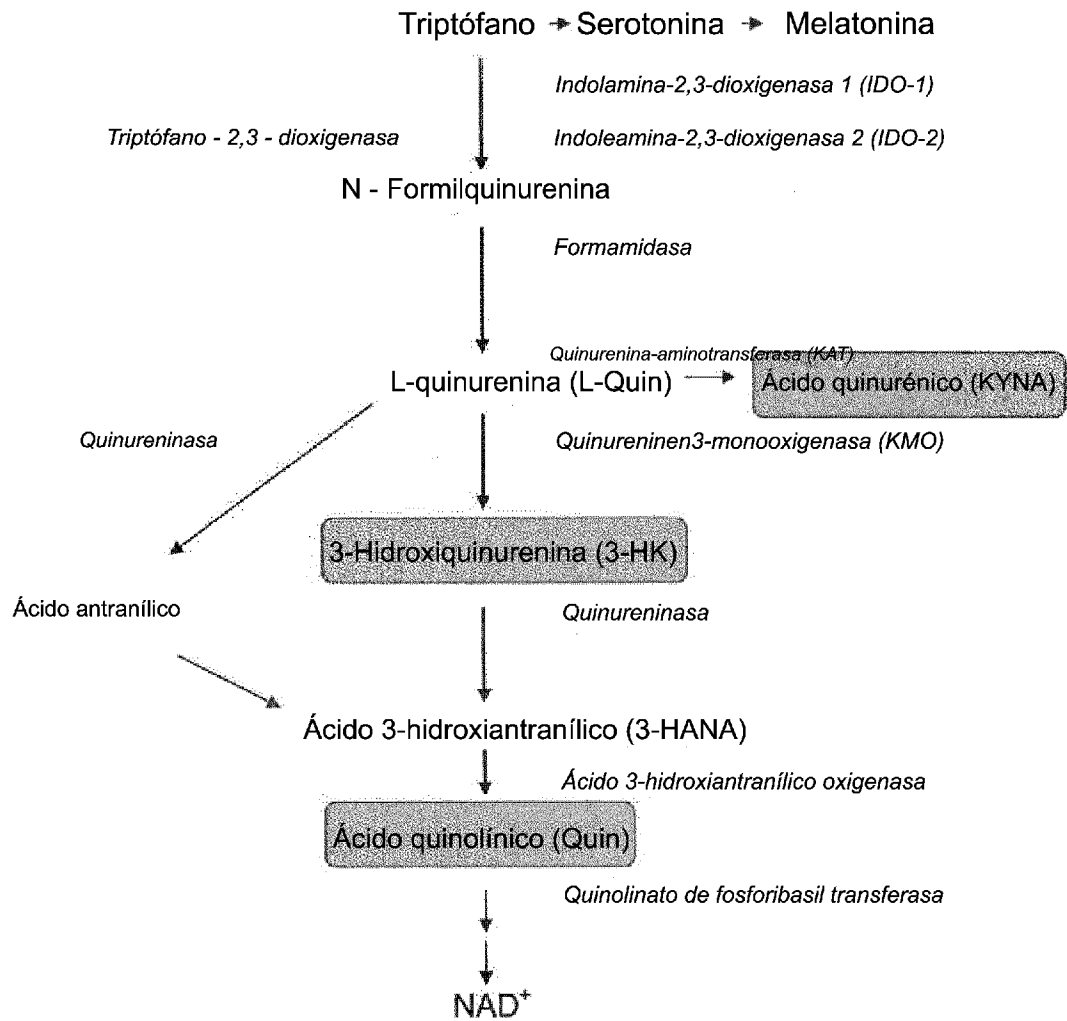


Figura 8: Descripción esquemática de la vía de la quinurenina, la principal vía de degradación del triptófano en eucariotas superiores. Las enzimas se indican en cursiva. Los metabolitos neurotóxicos Quin y 3-HK están resaltados en rojo y el metabolito neuroprotector KYNA en verde

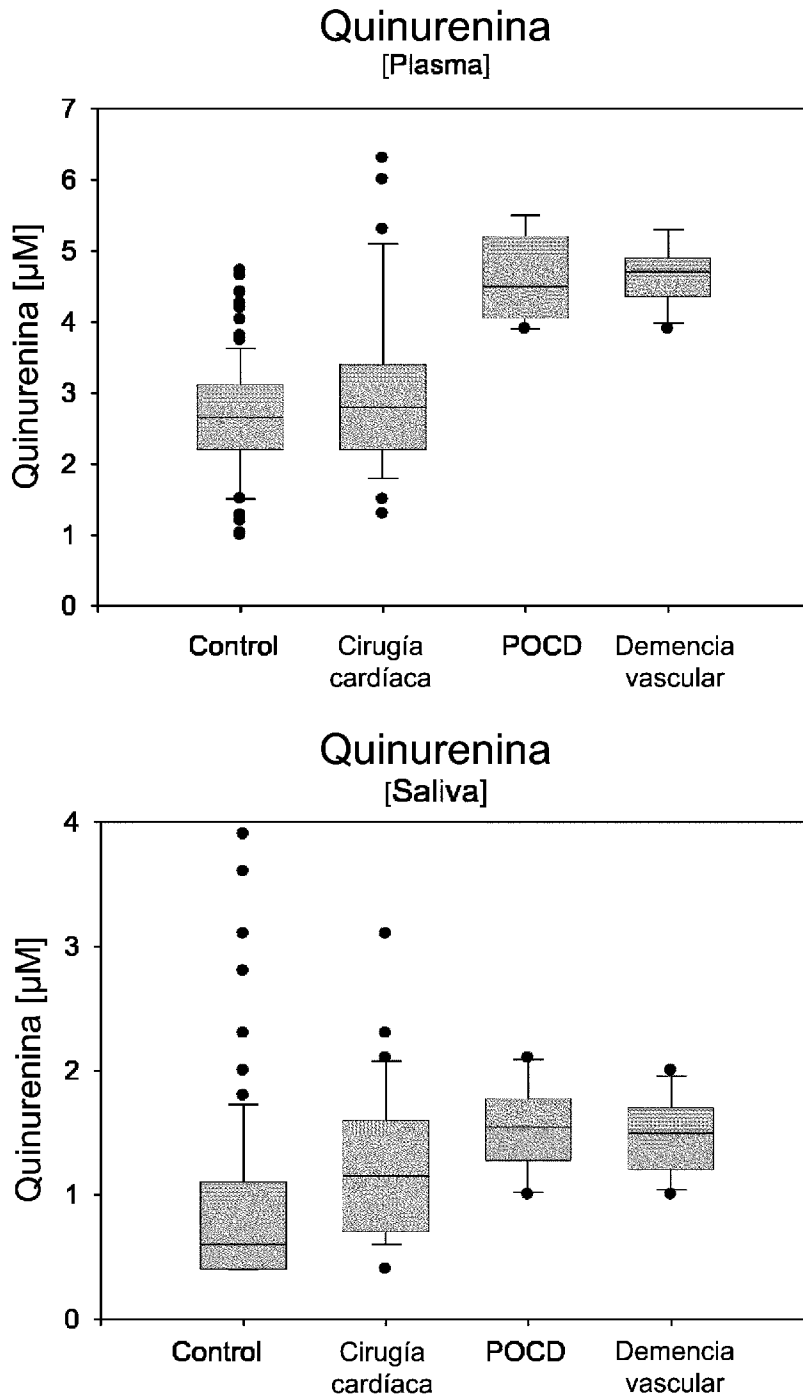


Figura 9: Comparación de quinurenina (medida en plasma y saliva) en 4 grupos: Control n = 116; pacientes antes de una cirugía cardíaca n = 51; pacientes con trastorno cerebral postoperatorio n = 8 y pacientes con demencia cerebral (antes del tratamiento) n = 9.

Hubo una diferencia significativa entre el control, POCD y la demencia vascular ($p < 0,001$). Resultados similares entre cirugía cardíaca y POCD y DV ($p < 0,05$), encontrados tanto en plasma como en saliva.