



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 666**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02805875 .8**

96 Fecha de presentación : **19.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1456405**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

54 Título: **Procedimiento y estuche de ensayo para detectar esfingomielinasa alcalina.**

30 Prioridad: **21.12.2001 IE 2001/1100**

73 Titular/es: **ACTIAL Farmaceutica Lda.**
Rua Dos Ferreiros, 260
P-9000-082 Funchal, PT

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

72 Inventor/es: **De Simone, Claudio**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 312 666 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

Procedimiento y estuche de ensayo para detectar esfingomielinasa alcalina.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento analítico para valorar la presencia de esfingomielinasa alcalina en las de posiciones de fluidos biológicos de pacientes que necesitan esta valoración. La invención se refiere también a un estuche de ensayo para llevar a cabo el procedimiento analítico.

10 Más particularmente, el procedimiento de la presente invención es un procedimiento fluorométrico *in Vitro* para detectar esfingomielinasa alcalina que, como se describirá en detalle con posterioridad, es un marcador de estados patológicos graves como cáncer de colon y poliposis adenomatosa familiar.

15 La enzima esfingomielinasa (fosfodiesterasa de esfingomielina, SMasa) cataliza la hidrólisis de esfingomielina a ceramida y fosfato de colina. Hasta la fecha han sido identificados tres tipos diferentes de SMasa (ácido, neutro y alcalino), que se producen en diversas iso-formas, como sigue:

- SMasa ácida lisosomal (A-SMasa);
- SMasa ácida citosólica dependiente de Zn^{2+} ;
- 20 - SMasa neutra de membrana dependiente de magnesio (N-SMasa);
- N-SMasa citosólica independiente de magnesio; y
- 25 - SMasa alcalina.

30 Las SMasas se conoce que desempeñan una función en una amplia diversidad de procesos fisiológicos y patológicos, que incluyen: hidrólisis lisosomal de SM endocitosada, señalización de células mediada por ceramida, aterogénesis, diferenciación Terminal, detención de ciclos celulares, apoptosis, inflamación y la regulación de respuestas de estrés eucariótico.

35 Contrariamente a la SMasa ácida y neutra, que están presentes actualmente en células como enzimas lisosomales y unidas a membranas, respectivamente, la SMasa alcalina exhibe diferencia de tejidos y especies. En seres humanos, la SMasa alcalina se encuentra en la mucosa intestinal y la bilis. La SMasa alcalina comienza a aparecer en el duodeno, alcanza un nivel elevado en el intestino, especialmente en la parte distante del yeyuno y se produce en cantidades considerables en el colon y el recto. Esta SMasa presenta un pH alcalino óptimo a 9,0 es independiente de Mg^{2+} , dependiente de sales de bilis y resistente a la tripsina.

40 La importancia patológica de la SMasa alcalina solo ha sido reconocida recientemente y esto a propiciado que se lleven a cabo diversos estudios, principalmente por las siguientes razones.

45 En primer lugar, la enzima puede ser responsable de la hidrólisis de esfingomielina de la dieta que se produce sustancialmente en la leche, huevos, carne y pescado. En segundo lugar, esta enzima puede regular la absorción de colesterol. En tercer lugar, la presencia de SMasa alcalina a lo largo del tracto intestinal y su disminución selectiva detectada en carcinomas colo-rectales sugiere que esta enzima desempeña una función en la carcinogénesis intestinal ya que, bajo condiciones fisiológicas, estimula la apoptosis y protege la mucosa intestinal contra la carcinogénesis.

50 Estudios previos han mostrado también que bajo condiciones fisiológicas, la SMasa alcalina se disocia por las sales de bilis desde de la membrana mucosal intestinal hasta el lumen. Sin embargo, bajo condiciones patológicas, en la que aumenta anormalmente la concentración de sal de bilis, la disociación de SMasa alcalina por sales de bilis puede sobrepasar la biosíntesis de la enzima, dando lugar a un nivel bajo de actividad de SMasa alcalina en la mucosa y una excreción anormalmente aumentada de la enzima en las heces o fluidos biológicos, es decir la bilis. Consecuentemente, el exceso de SMasa alcalina excretada en las de posiciones o en los fluidos biológicos sobre los valores basales, normales puede ser interpretado como un marcador de diagnóstico útil para el carcinoma rectal de colon y la poliposis adenomatosa familiar, de ahí la necesidad de un ensayo fiable para detectar SMasa alcalina en las de posiciones o en los fluidos biológicos de pacientes que puedan padecer las patologías anteriormente mencionadas del tracto intestinal.

60 Además, algunas cepas de bacterias (por ejemplo, *Streptococcus termophilus* *Lactobacilli*) contienen niveles elevados de SMasa y la valoración de SMasa alcalina puede proporcionar un procedimiento para evaluar los cambios en el número de dichas bacterias, es decir, después de un tratamiento con productos prebióticos y/o basados en probióticos.

65 Son ya conocidos procedimientos previos para valorar SMasa alcalina. La actividad de las SMasas se puede determinar *in vivo* a través de un marcador celular con un precursor radioactivo de SM y determinando seguidamente los niveles de marcado de producto o *in Vitro* usando SM radiomarcado o un análogo cromógeno de SM o derivados coloreados y fluorescentes de SM neutra.

ES 2 312 666 T3

Estos ensayos comúnmente usados no son completamente satisfactorios ya que son potencialmente muy peligrosos en la medida en que son ensayos radioactivos menos sensibles que un ensayo fluorométrico.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un ensayo fiable y económico para SMasa alcalina en deposiciones o fluidos biológicos de pacientes que pueden padecer carcinoma colorectal y poliposis adenomatosa familiar, o enfermedades de cresta de gallo o hígado, que supere los inconvenientes de los procedimientos conocidos.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un estuche de ensayo analítico para ser usado en el ensayo anteriormente mencionado.

Otro objeto de la presente invención es la valoración de la colonización bacteriana en diferentes estados de salud o a continuación enfermedades o un tratamiento con fármacos o prebióticos o complementos alimenticios.

El procedimiento de ensayo fluorométrico indirecto de la presente invención se basa en la siguiente secuencia de reacciones.

Bajo la acción de Smasa alcalina, presente en las heces u otros fluidos biológicos, la esfingomielina es hidrolizada a ceramida y fosforilcolina que, bajo la acción de fosfatasa alcalina, es hidrolizada produciendo colina. En presencia de colina oxidasa, la colina produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Este último compuesto, en presencia de peroxidasa de rabanillo, se provoca que reaccione con 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina, una sonda fluorógena sensible para H_2O_2 (en lo sucesivo denominada “reactivo de rojo amplex”) produciendo el compuesto altamente fluorescente resorufina. La fluorescencia es medida con un fluorómetro de microplaca de recuento de flúor usando una excitación a 530-560 nm y una detección de la fluorescencia a 590 nm.

Basándose en la secuencia de reacciones anteriormente mencionada y los medios de detección de la fluorescencia, el procedimiento de ensayo de la presente invención para ensayar SMasa alcalina comprende las siguientes etapas, que se refieren a deposiciones. Sin embargo, debe ser evidente para un experto en la técnica que este procedimiento puede ser fácilmente aplicado también a fluidos biológicos como bilis con variaciones rutinarias apropiadas,

1) recoger una muestra de deposiciones del paciente y secarla.

2) pesar aproximadamente 3-4 gramos de la muestra seca y ponerla en suspensión en 20 ml de tampón de homogeneización que contiene sacarosa 0,25 M, KCl 0,15 M, KH_2PO_4 50 mM, pH 7,4;

3) centrifugar la muestra a 4.000 rpm a $+4^\circ C$ durante 60 minutos;

4) recuperar la materia sobrenadante y centrifugar nuevamente durante 15 minutos a 4.000 rpm a $+4^\circ C$;

5) medir el contenido de proteínas en la materia sobrenadante con el ensayo de proteínas de Pierce con albumina de suero bovino como patrón usando para cada muestra una gama de concentración de proteína entre 32 mg/ml y 40 mg/ml y pipeteando 25 μl de cada muestra en un pocillo;

6) añadir a cada muestra de 25 μl 65 μl de tampón del ensayo que contiene Tris /HCl 50 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,15 M, pH 9,0 y 10 μl de esfingomielina 29 μM y en un tampón de ensayo añadir sales de bilis (TC, TDC, GC, GDC) en la concentración de 3 mM;

7) incubar a $37^\circ C$ durante 1 h;

8) pipetear 100 μl de cada muestra (véase con posterioridad) y 10 μl de esfingomielina (29 μM) incubando durante 1 h a $37^\circ C$ como las muestras;

9) después de 1 hora, añadir 100 μl de tampón de la reacción que contiene Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, β -glicerofosfato 10 mM, ATP 750 μM , EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, rojo de Amplex 100 μM , 8 U/ml de fosfatasa alcalina, 0,2 U/ml de colina oxidasa y 2 U/ml de peroxidasa de rabanillo;

10) incubar las reacciones durante una hora o más a $37^\circ C$, protegidas de la luz;

11) medir la fluorescencia en un lector de microplacas de la fluorescencia, usando una excitación en el intervalo de 530-560 nm y la detección de la emisión a 590 nm;

12) para cada punto, corregir en cuanto a la fluorescencia de fondo sustrayendo los valores derivados del testigo sin esfingomielinasa.

La invención se refiere también a un estuche de ensayo para detectar esfingomielinasa alcalina en las deposiciones o fluidos biológicos de un paciente según el procedimiento previamente descrito que comprende tubos de ensayo que contienen separadamente muestras de los siguientes reactivos:

ES 2 312 666 T3

a) esfingomielina que va a ser hidrolizada por esfingomielinasa alcalina presente en las deposiciones o fluidos biológicos, para proporcionar fosforilcolina;

b) fosfatasa alcalina para catalizar la hidrólisis de fosforilcolina a colina;

c) colina oxidasa para oxidar colina a peróxido de hidrógeno;

d) peróxidasa de rabanillo para ayudar a la reacción de peróxido de hidrógeno con

e) reactivo de rojo de Ampler (10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina) para proporcionar el compuesto fluorescente resorufina cuya fluorescencia es un marcador de la SMasa alcalina presente en las deposiciones o fluidos biológicos; y

f) esfingomielinasa bacteriana liofilizada para ser usada como concentrado estándar.

Para que se lleve adecuadamente el procedimiento analítico de la presente invención, además de los componentes del estuche de ensayo anteriormente mencionados, son necesarios los siguientes materiales y dispositivos adicionales:

Sacarosa;

Cloruro de potasio (KCl);

Fosfato de potasio, monobásico (KH_2PO_4);

Base de trizma;

EDTA;

Cloruro de sodio;

Taurocolato (TC);

Taurodesoxicolato (TDC);

Glicocolato (GC);

Glicochenodesoxicolato (GCDC);

β -glicerofosfato;

Sal de disodio de ATP;

EGTA;

Reactivo de ensayo de proteína BCA;

Albumina de suero bovino;

Un centrifugador refrigerado;

Un lector de microplatas capaz de una medición a 550-562 nm, y

Un fluorómetro de microplaca de recuento de flúor.

Con el fin de realizar la cuantificación de la actividad de SMasa, se deben tomar las siguientes mediciones.

Preparación de curva estándar

Este estuche de ensayo es suministrado con una preparación estándar de SMasa, consiste en un extracto bacteriano que contiene un tipo de SMasa que funciona a pH 9. Se deben realizar las siguientes operaciones.

Generar una curva de calibración de SMasa: se diluye el concentrado estándar para preparar diluciones en serie.

Se reconstituye el patrón de SMasa con 1 ml de tampón del ensayo (pH 9,0); esta reconstitución produce una solución madre de 96 mU/ ml.

Se pipetea 0,500 ml de tampón del ensayo en cada tubo. Se usa la solución madre para producir una serie de diluciones. Se mezcla cada tubo a fondo antes de la siguiente transferencia. El patrón sin diluir sirve como el pa-

ES 2 312 666 T3

trón elevado (96 mU/ml), y la curva estándar contendrá las siguientes concentraciones (mU/ml): 96-48-24-12-6-3. El tampón sirve como el patrón cero (0 mU/ml).

Curvas estándar típicas

En la Figura 1 se muestra la curva estándar solo para una demostración. Una curva estándar debe ser generada para conjunto de muestras ensayadas.

Calculo de resultados

Se calcula la media de las lecturas por duplicado para cada patrón y muestra y se sustrae la fluorescencia media estándar cero.

Se representa gráficamente la fluorescencia para los patrones frente a la actividad (mU/ml) de los patrones y se traza la mejor curva. Para determinar la actividad de SMasa de cada muestra, en primer lugar se encuentra el valor de la fluorescencia en el eje Y y se extiende una línea horizontal para la curva estándar. En el punto de intersección, se extiende una línea vertical para el eje x y se lee la correspondiente actividad de SMasa.

El procedimiento descrito es capaz de ensayar la actividad de SMasa *in Vitro*; ha sido desarrollado en un intento de detectar SMasa alcalina en una muestra orgánica.

Para ensayar específicamente la SMasa alcalina, el procedimiento usa condiciones que detectan la actividad de SMasas ácida y neutra. De hecho:

- el tampón de homogeneización está a pH neutro, pero no tiene inhibidores de proteasa y fosfatasa para excluir la SMasa neutra, ya que esta última es sensible a las actividades de proteasas y fosfatasa y consecuentemente es inhibida por estas enzimas;
- en el tampón de homogeneización, el $MgCl_2$ está ausente para bloquear la actividad de SMasa neutra dependiente de Mg;
- El tampón de la reacción contiene β -glicerofosfato y ATP para impedir la actividad de SMasa ácida a pH neutro, en este tampón están presentes EDTA y EGTA a una concentración elevada para inhibir la SMasa neutra.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar *in Vitro* esfingomielinasa alcalina en una muestra de material biológico de un paciente, que comprende las etapas de
 - a) poner en suspensión la muestra en un tampón de homogeneización que contiene sacarosa 0,24-0,26 M, KCl 0,14-0,16 M, KH_2PO_4 45-55 mM, ajustado a aproximadamente pH 7,4;
 - b) centrifugar la muestra al menos una vez y recuperar la materia sobrenadante;
 - c) medir el contenido de proteína en la materia sobrenadante;
 - d) añadir a una muestra de la materia sobrenadante un tampón del ensayo que contiene Tris/HCl 45-55 mM, EDTA 1,9-2,2 mM, NaCl 0,14-0,16 M, pH 8,9-9,1, esfingomielina 28-31 μM y un tampón del ensayo que contiene las sales de bilis TC, TDC, GC, GCDC a una concentración de 2,9-3,1 mM;
 - e) incubar la mezcla del ensayo a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 1 hora;
 - f) mezclar una muestra de la etapa d) con esfingomielina 28-30 μM e incubar durante aproximadamente 1 h a aproximadamente 37°C;
 - g) adición de un tampón de reacción que contiene Tris/HCl 45-55 mM, pH 7,3-7,5, β -glicerofosfato 9-11 mM, ATP 745-755 μM , EDTA 4-6 mM, EGTA 4-6 mM, reactivo de rojo Amplex 95.105, 7-9 U/ml de fosfatasa alcalina, 0,1-0,3 U/ml de colina oxidasa y 1,5-2,5 U/ml de peroxidasa de rabanillo; y
 - h) incubar la mezcla de reacción durante al menos 1 hora a aproximadamente 37°C, protegida de la luz;
 - i) medir la fluorescencia usando una excitación en el intervalo de 530-560 y emisión a aproximadamente 590 nm.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que para cada muestra, la lectura de la fluorescencia es corregida en cuanto a la fluorescencia de fondo sustrayendo los valores derivados de un testigo sin esfingomielinasa.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el contenido de proteínas es medido mediante el ensayo de proteínas de Pierce.
4. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el material biológico es una deposición de un paciente, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
 - a) secar una muestra de deposiciones del paciente;
 - b) pesar aproximadamente 3-4 gramos de muestra seca y ponerla en suspensión en 20 ml de tampón de homogeneización que contiene sacarosa 0,25 M, KCl 0,15 M, KH_2PO_4 50 mM, pH 7,4;
 - c) centrifugar la muestra a 4.000 rpm a + 4°C durante 50 minutos;
 - d) recuperar la materia sobrenadante y centrifugar nuevamente durante 15 minutos a 4.000 rpm a + 4°C;
 - e) medir el contenido de proteínas en la materia sobrenadante con el ensayo de proteínas de Pierce con albumina de suero bovino como patrón usando para cada muestra un intervalo de concentración de proteínas entre 32 mg/ml y 40 mg/ml y pipetear 25 μl de cada muestra en un pocillo;
 - f) añadir a cada muestra de 25 μl 65 μl de tampón del ensayo que contiene Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,15 M, pH 9,0 y 10 μl de esfingomielina 29 μM y en el tampón del ensayo medir las sales de bilis TC, TDC, GC, GCDC en la concentración de 3 mM;
 - g) incubar a 37°C durante 1 h;
 - h) pipetear 100 μl de cada esfingomielinasa bacteriana liofilizada estándar y 10 μl de esfingomielina 29 μM , incubar durante 1 h a 37°C como las muestras.
 - i) después de 1 hora, añadir 100 μl de tampón de la reacción que contiene Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, β -glicerofosfato 10 mM, ATP 750 μM , EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, rojo de Amplex 100 μM , 8 U/ml de fosfatasa alcalina, 0,2 U/ml de colina oxidasa, 2 U/ml de peroxidasa de rabanillo;
 - j) incubar las reacciones durante 1 hora o más a 37°C, protegidas de la luz; y

ES 2 312 666 T3

m) medir la fluorescencia en un lector de microplacas de fluorescencia usando una excitación en el intervalo de 530-560 y la emisión a aproximadamente 590 nm;

n) para cada punto corregir en cuanto a la fluorescencia de fondo sustrayendo los valores derivados de un testigo sin esfingomielinasa.

5 El procedimiento de la reivindicación 4, aplicado a fluidos biológicos.

10 6. Un estuche de ensayo para detectar esfingomielinasa alcalina en un material biológico de un paciente, que comprende tubos de ensayo que contienen separadamente muestras de los siguientes reactivos:

a) esfingomielina que va a ser hidrolizada a un pH que varía en el intervalo entre 8,9-9,1 mediante esfingomielinasa alcalina presente en las deposiciones o fluidos biológicos, para proporcionar fosforilcolina;

15 b) fosfatasa alcalina para catalizar la hidrólisis de fosforilcolina a colina;

c) colina oxidasa para oxidar colina a peróxido de hidrógeno;

20 d) peroxidasa de rabanillo para ayudar a la reacción de peróxido de hidrógeno con

e) reactivo de rojo de Amplex (10-acetil-3,7-dihidrofenoazina) para proporcionar el compuesto fluorescente resorufina cuya fluorescencia es un marcador de la esfingomielinasa alcalina presente en las deposiciones o fluidos biológicos;

25 f) esfingomielinasa bacteriana liofilizada para ser usado como un concentrado estándar;

g) un tampón del ensayo a pH 8,9-9,1 que contiene EDTA;

30 h) sales de bilis TD, TDC, GC, y GCDC;

i) un tampón de la reacción que contiene EDTA y EGTA, β -glicerofosfato y ATP.

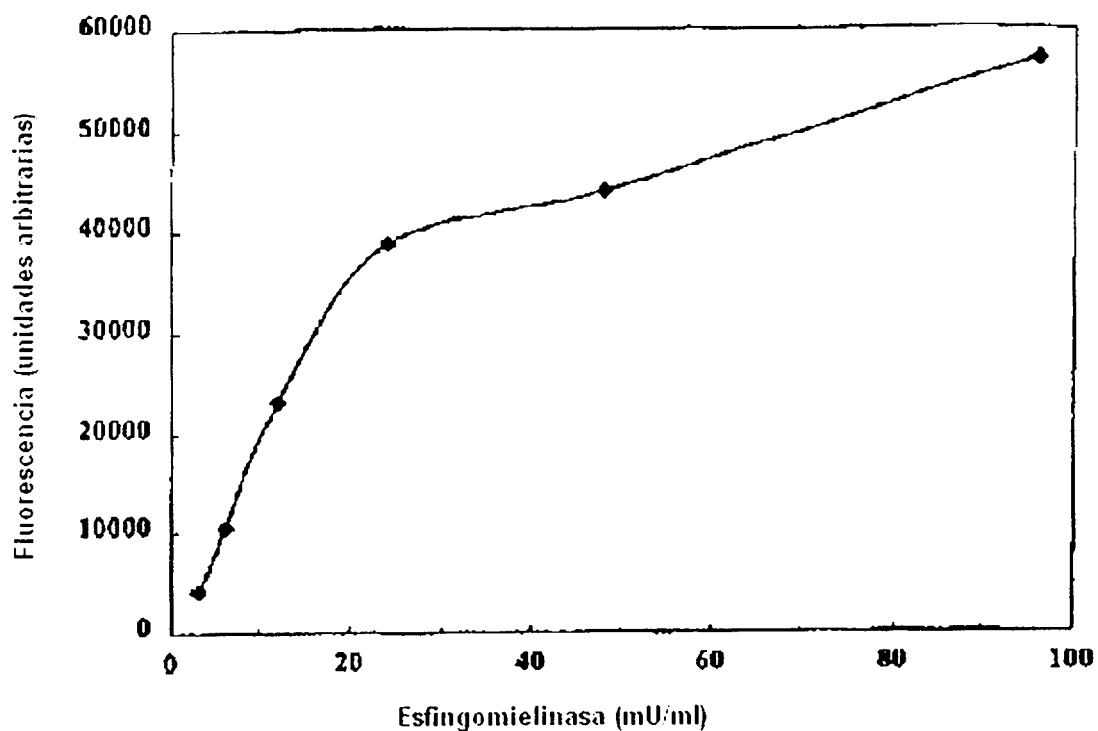


Figura 1. Detección de esfingomielinasa usando el ensayo de fluorescencia. Cada reacción contenía la cantidad indicada de esfingomielinasa en tampón de ensayo específico.

Las reacciones se incubaron a 37°C durante una hora. La fluorescencia se midió con un lector de fluorescencia de microplaca usando una excitación a 530 nm y detección de la fluorescencia a 590 nm.