

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 857**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2018** **PCT/JP2018/024114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2019** **WO19004168**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2018** **E 18822661 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024** **EP 3647785**

54 Título: **Procedimiento para medir el amiloide a sérico de diversos animales y reactivo para su medición**

30 Prioridad:

26.06.2017 JP 2017124578

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2025

73 Titular/es:

EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA (100.00%)
4-19-9, Taito
Taito-kuTokyo 110-8408, JP

72 Inventor/es:

ASAHI, YUKARI y
WADA, ATSUFUMI

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 012 857 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 para medir el amiloide a sérico de diversos animales y reactivo para su medición

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para medir el amiloide A sérico (en lo sucesivo, denominado "SAA") de diversos animales.

[Técnica de antecedente]

10 La SAA es una proteína precursora de la proteína amiloide A que se deposita en el tejido en caso de amiloidosis, que es una proteína sérica con un peso molecular de aproximadamente 12.000 (Documento de no Patente 1). Se sabe que la concentración sérica de SAA aumenta en enfermedades inflamatorias distintas de la amiloidosis, por lo que se reconoce que el SAA es un marcador sensible de inflamación (Documento de no patente 2).

Además, se sabe que la SAA sirve como un marcador de inflamación importante en especies animales distintas de los seres humanos (Documentos de no patente 3 a 7).

15 Por ejemplo, el Documento de Patente 1 divulga una correlación aparente entre el nivel de proteína SAA en una muestra de leche obtenida de la mama de un mamífero lactante (por ejemplo, bovino) y el nivel de respuesta inflamatoria del tejido mamario (es decir, mastitis). El Documento de Patente 2 divulga que las enfermedades infecciosas pueden distinguirse de las causas no infecciosas de enfermedades basándose en la concentración de SAA en una muestra de sangre obtenida de un mamífero (por ejemplo, un caballo) que muestre síntomas o acciones anormales.

20 Por ejemplo, el Documento de Patente 3 divulga un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a SAA humano, y el Documento de Patente 4 divulga un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a SAA equino. Sin embargo, en el pasado no se conocían reactivos capaces de medir la SAA derivada de diversas especies animales, incluida la humana, que implicaran el uso de anticuerpos monoclonales.

[Documentos del Estado de la Técnica]

[Documentos de patente]

25 [Documento de Patente 1] JP 2003-507725 A
[Documento de Patente 2] WO 2014/118764
[Documento de Patente 3] JP H09-67398 A (1997)
[Documento de Patente 4] JP 2008-239511 A

[Documentos de no patente]

30 [Documento de no patente 1] Husby G. y Natvig J. B., J. Clin. Invest, 1974, Vol. 53, pp. 1054-1061
[Documento de no patente 2] Yamada, T. et al., Journal of Clinical Laboratory Medicine, 1988, 32:2, pp. 167-172.
[Documento de no patente 3] Nunokawa Y. et al., J. Vet. Med. Sci., 1993, 55 (6), pp. 1011-1016
[Documento de no patente 4] Kajikawa, T. et al., J. Vet. Med. Sci., 1996, 58 (11), pp. 1141-1143
35 [Documento de no patente 5] Tamamoto, T. et al., J. Vet. Med. Sci., 2008, 70 (11), pp. 1247-1252
[Documento de no patente 6] Petersen, H. H. et al., Vet. Res., 2004, 35(2), pp. 163-187
[Documento de no patente 7] Tamamoto, T., Journal of Hokkaido Veterinary Medical Association, 2014, 58, pp. 539-543.

[Sumario de la invención]

40 [Objetivos que se pretenden alcanzar con la invención]

Bajo las circunstancias anteriores, es un objeto de la presente invención proporcionar un reactivo que pueda medir SAA derivado de diversas especies animales.

[Medios para alcanzar los objetivos]

Los presentes inventores han realizado estudios concentrados para alcanzar el objeto anterior. Como resultado, encontraron un anticuerpo monoclonal de reacción cruzada con especies animales que reconoce la SAA derivada de diversas especies animales de entre los anticuerpos monoclonales antiSAA humanos. Esto ha llevado a la realización de la presente invención.

Específicamente, la presente invención incluye lo siguiente.

(1) Un procedimiento para medir inmunológicamente el amiloide sérico A que comprende un paso de medir el amiloide sérico A utilizando un reactivo para medir el amiloide sérico A de una pluralidad de especies animales, comprendiendo dicho reactivo un anticuerpo monoclonal antisuero amiloide A de reactividad cruzada con especies animales o un fragmento del mismo,

en el que dicho anticuerpo monoclonal antisuero amiloide A de reactividad cruzada con especies animales o un fragmento del mismo se une específicamente, como epítipo de la proteína amiloide A del suero, a los residuos de aminoácidos en las posiciones 80^a a 90^a desde el extremo N de la proteína amiloide A1 del suero humano maduro que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1,

en el que dicho fragmento de anticuerpo monoclonal se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd y Fabc,

en la que la pluralidad de especies animales son una pluralidad de especies animales seleccionadas del grupo que consiste en un humano, un bovino, un perro, un gato, un conejo, un caballo, un mono, un cerdo, una oveja, un burro y un ratón, y

en el que el procedimiento para la medición inmunológica es el inmunoensayo turbidimétrico de látex.

La solicitud de patente japonesa No. 2017-124578 es el documento prioritario de la presente solicitud.

[Efectos de la invención]

Con el procedimiento para medir inmunológicamente SAA de acuerdo con la presente invención, SAA, que es un marcador de inflamación para diversas especies animales, puede detectarse o medirse fácilmente.

[Breve descripción de los dibujos]

La Fig. 1 muestra los resultados de la medición de una muestra bovina utilizando un reactivo de látex compuesto por partículas de látex de poliestireno de 130 nm de diámetro y un anticuerpo policlonal anti SAA humano inmovilizado en ellas.

La Fig. 2 muestra los resultados del cribado de un anticuerpo monoclonal anti SAA humano utilizando una muestra bovina.

La Fig. 3 muestra los resultados de la medición de una serie de diluciones de muestras de suero con una concentración conocida de SAA humano utilizando un reactivo de látex compuesto por partículas de látex de poliestireno de 130 nm de diámetro y el anticuerpo monoclonal (Clon 15), que se confirmó que era reactivo con SAA bovino, inmovilizado en las mismas.

La Fig. 4 muestra los resultados de la medición de una serie de diluciones de muestras de suero con concentración de SAA humana conocida (curva de calibración) utilizando un reactivo de látex (SAA-M) preparado inmovilizando el anticuerpo monoclonal antiSAA de reactividad cruzada con especies animales (Clon 15) que se une a SAA reconociendo, como epítipo, una región en las proximidades de un residuo de aminoácido en la posición 90 desde el extremo N de la proteína SAA1 humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 o una región en las proximidades de un residuo de aminoácido correspondiente en otra proteína SAA madura a dos tipos de partículas de látex de poliestireno (es decir, partículas de 220 nm de diámetro y partículas de 80 nm de diámetro) y mezclando los dos tipos de partículas de látex de poliestireno en una proporción de 2:1.

La Fig. 5 muestra los resultados de la medición de las muestras de suero de bovino, perro y gato utilizando un reactivo de látex (SAA-M) preparado inmovilizando el anticuerpo monoclonal anti-SAA de reactividad cruzada con especies animales (Clon 15) en dos tipos de partículas de látex (es decir, partículas de 220 nm de diámetro y partículas de 80 nm de diámetro) y mezclando los dos tipos de partículas de látex a 2:1.

La Fig. 6 muestra los resultados de la medición de SAA en muestras de suero obtenidas de diversos animales (un bovino, un caballo, un mono, un asno, una oveja, un cerdo, un carpincho, un ratón y un conejo) utilizando un reactivo de látex preparado inmovilizando el anticuerpo monoclonal anti-SAA de reactividad cruzada con especies animales (Clon 15) en partículas de látex de poliestireno de 215 nm de diámetro.

5 La Fig. 7 muestra los resultados del examen de reactividad de los anticuerpos monoclonales anti SAA humana (Clones 15, 18 y 21) con muestras de suero obtenidas de diversos animales (un humano, un gato, un perro, un caballo, un bovino, un mono, un carpincho y un ratón).

La Fig. 8 muestra un mapa de las matrices utilizadas para el mapeo de epítomos de los anticuerpos monoclonales anti SAA humano (Clones 15, 18 y 21).

10 La Fig. 9 muestra los resultados del examen de la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti SAA humana (Clones 15, 18 y 21) con cada péptido derivado de la proteína SAA1 humana madura.

La Fig. 10 muestra los resultados del examen de la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti SAA humana (Clones 15, 18 y 21) con cada péptido derivado de la proteína SAA1 humana madura: (A) muestra imágenes fluorescentes en las matrices utilizadas para el mapeo de epítomos; (B) muestra un mapa de las matrices utilizadas para el mapeo de epítomos; y (C): muestra una comparación de las secuencias de aminoácidos de cada péptido derivado de la proteína SAA1 humana madura.

[Realizaciones de la invención]

A continuación, se describe en detalle la presente invención.

20 El reactivo para medir SAA obtenido a partir de una pluralidad de (es decir, 2 o más) especies animales utilizado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención (en lo sucesivo, denominado "el reactivo para medir SAA de acuerdo con la presente divulgación") comprende un anticuerpo monoclonal anti-SAA de reactividad cruzada con especies animales o un fragmento del mismo. El anticuerpo monoclonal antiSAA de reactividad cruzada con especies animales o un fragmento del mismo utilizado en el procedimiento de la presente invención (en lo sucesivo, denominado "el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente divulgación") es un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer SAA derivado de diversas especies animales y unirse a dicha proteína o a un fragmento de la misma. Con el uso del procedimiento para medir la SAA de acuerdo con la presente invención, se puede medir inmunológicamente la SAA como marcador de inflamación en diversas especies animales.

Ejemplos de SAA que el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo usado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede reconocer incluyen SAA derivado de especies animales, tales como un humano, un bovino, un perro, un gato, un conejo, un caballo, un mono, un cerdo, una oveja, un burro y un ratón.

35 El anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo utilizado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención se une preferentemente a SAA reconociendo, como epítipo, los residuos de aminoácidos en las posiciones 80^a a 90^a desde el extremo N de la proteína amiloide A1 sérica humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1. El anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo utilizado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención que se une a dicho epítipo presenta una elevada propiedad de unión a SAA obtenida de una pluralidad de especies animales. Una región de residuos de aminoácidos en otra proteína SAA madura (por ejemplo, una proteína SAA madura derivada de una especie animal distinta de la humana) correspondiente a una región en las proximidades de un residuo de aminoácido en la posición 90 desde el extremo N de la proteína SAA1 humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 a la que se une como epítipo el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo utilizado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, puede determinarse mediante, por ejemplo, comparación de alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de la proteína SAA1 humana madura y la secuencia de aminoácidos de otra proteína SAA madura de acuerdo con un procedimiento conocido convencionalmente.

45 El anticuerpo monoclonal usado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede ser de cualquier clase de inmunoglobulina (Ig) (por ejemplo, IgA, IgG, IgE, IgD, IgM o IgY) y cualquier subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2). La cadena ligera de inmunoglobulina puede ser una cadena κ o una cadena λ .

Ejemplos del fragmento de anticuerpo monoclonal usado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, y Fabc. Los procedimientos para preparar dichos fragmentos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, dichos fragmentos pueden obtenerse por digestión de moléculas de anticuerpo con una proteasa tal como la papaína o la pepsina o mediante una técnica conocida de ingeniería genética.

El anticuerpo monoclonal usado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede obtenerse preparando hibridomas a partir de células productoras de anticuerpos obtenidas de mamíferos no humanos

inmunizados con antígenos (SAA humanos) (por ejemplo, células del bazo o linfáticas) y células de mieloma mediante fusión, proliferando los hibridomas obtenidos en un medio de selección que contenga hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), clonando células productoras de anticuerpos monoclonales que presenten afinidad específica por los antígenos utilizados para la inmunización (SAA humano) o antígenos peptídicos fragmentados de los mismos (por ejemplo, un antígeno peptídico que comprende una región en las proximidades de un residuo de aminoácido en la posición 90 desde el extremo N de la proteína SAA1 humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1), la obtención de líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales antiSAA humanos, la proliferación de las células productoras de anticuerpos monoclonales antihumanos en la cavidad abdominal del ratón y la purificación del anticuerpo a partir del líquido de ascitis resultante. Ejemplos de mamíferos no humanos incluyen roedores tales como ratones y ratas. Se utilizan preferentemente células de mieloma derivadas del mismo animal que los animales inmunizados, y ejemplos de las mismas incluyen células de mieloma de ratón y células de mieloma de rata. Las células productoras de anticuerpos pueden fusionarse con células de mieloma mediante el uso de polietilenglicol (PEG) o mediante fusión eléctrica.

El anticuerpo monoclonal preparado puede purificarse mediante un procedimiento conocido en la técnica, tal como cromatografía usando una columna de proteína A o una columna de proteína G, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, salado con sulfato de amonio, filtración en gel, o cromatografía de afinidad, en combinación adecuada.

La presente invención se refiere a un procedimiento para medir inmunológicamente SAA que comprende un paso de medir SAA usando el reactivo para medir SAA como se divulga en el presente documento. Específicamente, la SAA en una muestra biológica derivada de diversas especies animales se pone en contacto con el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo como se divulga en el presente documento en el reactivo para medir la SAA como se divulga en el presente documento para causar una reacción antígeno-anticuerpo, y la SAA en la muestra se detecta o mide basándose en el complejo inmune formado.

Una muestra biológica que comprende o puede comprender SAA es suficiente, y ejemplos de la misma incluyen muestras de sangre total, suero, plasma, orina, líquido de punción, sudor, saliva, linfa y líquido cefalorraquídeo.

Ejemplos de procedimientos para la medición inmunológica incluyen: inmunodifusión radial simple (no forma parte de la invención) que comprende observar la expresión de una línea de precipitado formada por un inmunocomplejo resultante de la unión del anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo como se divulga en el presente documento a SAA en la muestra biológica en una placa de agar; inmunoensayo enzimático (EIA) (no forma parte de la invención) o radioinmunoensayo (no forma parte de la invención) que comprende el uso del anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo según se divulga en el presente documento marcado con una enzima o isótopo radiactivo; y uso de un portador insoluble que comprende el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo según se divulga en el presente documento inmovilizado en el mismo. Ejemplos de portadores insolubles incluyen partículas tales como partículas de látex (tales como partículas de polietileno o poliestireno), partículas de alúmina (no incluidas en la invención), partículas de sílice (no incluidas en la invención), partículas de coloides de oro (no incluidas en la invención) y partículas magnéticas (no incluidas en la invención). Entre tales portadores insolubles, son preferibles las partículas de látex, y son particularmente preferibles las partículas de látex de poliestireno.

Las partículas portadoras insolubles son preferentemente de 50 a 500 nm de diámetro, y más preferentemente de 75 a 350 nm de diámetro.

Un anticuerpo o un fragmento del mismo puede inmovilizarse en un soporte insoluble de acuerdo con una técnica convencional. Específicamente, un anticuerpo o un fragmento del mismo se mezcla con un portador insoluble, y se permite que un anticuerpo o un fragmento del mismo se adsorba físicamente a la superficie del portador insoluble. Así, un anticuerpo o un fragmento del mismo puede inmovilizarse en el soporte insoluble.

Cuando se utiliza un soporte insoluble que comprende un grupo amino o carboxilo introducido en su superficie, un anticuerpo o un fragmento del mismo puede inmovilizarse en la superficie del soporte insoluble mediante una unión química que implica el uso de un reactivo de glutaraldehído o carbodiimida.

Ejemplos de procedimientos que comprenden el uso de portadores insolubles incluyen: un inmunoensayo turbidimétrico de látex que comprende el uso de partículas de látex que comprenden el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo usado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención inmovilizado en las mismas; colorimetría de aglutinación basada en coloide de oro (no forma parte de la invención) que comprende el uso de partículas de coloide de oro que comprenden el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención inmovilizado en coloides de oro; y ensayos inmunocromatográficos (no forman parte de la invención) que implican el uso del anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo según se divulga en el presente documento marcado con coloides metálicos y un anticuerpo de captura que captura un complejo inmunitario del anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo según se divulga en el presente documento y SAA en una membrana tal como

una membrana de nitrocelulosa. De acuerdo con el inmunoensayo turbidimétrico de látex, específicamente, se permite que las partículas de látex que comprenden el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo utilizado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención inmovilizado en el látex reaccionen con SAA en una muestra biológica, y se mide SAA basándose en la aglutinación de las partículas de látex como resultado de la formación del complejo inmunitario y los cambios en la turbidez causados por la aglutinación del látex. De acuerdo con los ensayos inmunocromatográficos (que no forman parte de la invención), se suministra una muestra biológica sobre una membrana tal como una membrana de nitrocelulosa, la SAA en la muestra biológica reacciona con el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo según se divulga en el presente documento en una región de retención de reactivos etiquetados que retiene el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo según se divulga en el presente documento etiquetado con coloides metálicos o similares para formar un inmunocomplejo, el inmunocomplejo migra sobre la membrana por la acción capilar, el inmunocomplejo es capturado por un anticuerpo de captura inmovilizado en una posición determinada sobre la membrana, y la SAA se detecta basándose en el color desarrollado como resultado de la captura.

[0029] Como se ha descrito anteriormente, el reactivo para medir SAA como se divulga en el presente documento puede usarse para un procedimiento para medir inmunológicamente SAA. Cuando el procedimiento para la medición inmunológica implica el uso de un portador insoluble, por ejemplo, el reactivo para medir SAA según se divulga en el presente documento puede contener un portador insoluble que comprenda el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo según se divulga en el presente documento inmovilizado en el mismo, tal como una solución de látex que contenga partículas de látex. Cuando se realizan ensayos inmunocromatográficos (que no forman parte de la invención), el reactivo para medir SAA según se divulga en el presente documento puede utilizarse para un dispositivo inmunocromatográfico compuesto por un soporte insoluble que comprende el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo según se divulga en el presente documento inmovilizado en el mismo, tal como coloides de oro, y una membrana tal como una membrana de nitrocelulosa que comprende el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo según se divulga en el presente documento inmovilizado en el mismo (por ejemplo, una membrana tal como una membrana de nitrocelulosa soportada sobre un soporte que comprende una región de suministro de muestras, una región de retención de reactivos etiquetados que retiene el anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo según se divulga en el presente documento etiquetado con coloides metálicos o similares, y una región de detección que comprende un anticuerpo de captura inmovilizado en una posición determinada).

[0030] Además del anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo usado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, el reactivo para medir SAA usado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede comprender un tampón que imparte un nivel de pH necesario para la reacción inmunológica, un potenciador de reacción que acelera la reacción inmunológica, un estabilizador o bloqueador de reacción que suprime la reacción no específica, un conservante que mejora la estabilidad de almacenamiento de un reactivo, tal como azida sódica, y similares.

[0031] Entre los ejemplos de tampones se incluyen los siguientes.

Los tampones de Good:

(Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; abreviado como "MES";

Piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico); abreviado como "PIPES";

Ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico; abreviado como "ACES";

Ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico; abreviado como "BES";

bis(2-hidroxietil)iminotris(hidroximetil)metano; abreviado como "Bis-Tris";

Ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2-hidroxipropanosulfónico; abreviado como "DIPSO";

Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-3-propanosulfónico; abreviado como "EPPS";

Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico; abreviado como "HEPES";

Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-hidroxipropano-3-sulfónico; abreviado como "HEPPSO";

Ácido 3-(N-morfolino)propanesulfónico; abreviado como "MOPS";

Ácido 3-(N-morfolino)-2-hidroxipropanosulfónico; abreviado como "MOPSO";

Piperazina-N,N'-bis(ácido 2-hidroxipropanosulfónico); abreviado como "POPSO";

Ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico; abreviado como "TAPS";

ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-hidroxi-3-aminopropanosulfónico; abreviado como "TAPSO"; y

Ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico; abreviado como "TES".

Otros tampones:

2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol; también denominado "tris(hidroximetil)aminometano";

5 Tampones de fosfato;

Tampón de amonio.

Entre tales tampones, los tampones de Good, tales como HEPES y PIPES, ajustan un nivel de pH a un nivel ventajoso para la reacción inmunológica. Además, su influencia sobre las proteínas es pequeña. Por lo tanto, estos tampones son especialmente preferibles. Un nivel de pH necesario para la reacción inmunológica es de 5 a 11, y preferentemente de 6 a 9.

Como potenciador de la reacción se conocen, por ejemplo, el polietilenglicol y el sulfato de dextrano. Además, se sabe que la BSA (albúmina sérica bovina), el suero animal, la IgG, los fragmentos de IgG (Fab y Fc), la albúmina, la proteína láctea, el aminoácido, el poliaminoácido, la colina, un polisacárido tal como la sacarosa, la gelatina, la gelatina degradada, la caseína, un alcohol polihídrico tal como la glicerina y similares estabilizan eficazmente la reacción o inhiben la reacción inespecífica en la reacción inmunológica en forma de estabilizadores o bloqueadores de la reacción.

El reactivo para medir SAA utilizado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención que comprende diversos componentes descritos anteriormente puede suministrarse en estado líquido o seco. Para realizar la distribución del reactivo en estado líquido, el reactivo puede complementarse, además, por ejemplo, con diversos tensioactivos, sacáridos o proteínas inactivas, con el fin de mejorar la estabilidad de la proteína. Dichos estabilizadores también son eficaces como estabilizadores o excipientes al secar el reactivo.

[Ejemplos]

A continuación, la presente invención se describe en mayor detalle con referencia a los Ejemplos.

En los Ejemplos comparativos y los Ejemplos siguientes, los epítomos de la proteína SAA1 humana madura (la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1) a los que se unen los anticuerpos monoclonales son los que se describen a continuación:

Clon 17: una región en la vecindad del residuo de aminoácido en la posición 30 desde el extremo N;

Clon 14: una región en las proximidades del residuo de aminoácido en la posición 15 desde el extremo N;

Clones 15 y 18: una región en la vecindad del residuo de aminoácido en la posición 90 desde el extremo N; y

Clones 21 y 25: desconocidos, aunque se deduce que el epítomo del clon 21 es el mismo que el del clon 15, etc., basándose en la reactividad con la SAA bovina.

[Ejemplo comparativo 1] Medición de una muestra de bovino utilizando un reactivo de látex que contiene un anticuerpo policlonal anti SAA humano inmovilizado en el mismo.

1. Objetivos

[0039] Se examinó si podía medirse o no SAA bovina usando un reactivo de látex que comprendía el anticuerpo policlonal anti SAA humano inmovilizado en partículas de látex de poliestireno.

(1) Inmovilización del anticuerpo policlonal anti SAA humano en partículas de látex de poliestireno

El anticuerpo policlonal anti SAA humano se inmovilizó en partículas de látex de poliestireno de 130 nm de diámetro.

El anticuerpo policlonal anti SAA humano se inmovilizó en las partículas de látex de poliestireno de acuerdo con una técnica convencional. Específicamente, el anticuerpo policlonal anti SAA humano se mezcló con látex de poliestireno, para permitir que el anticuerpo policlonal anti SAA humano se adsorbiera físicamente en la superficie del látex de poliestireno. Así, el anticuerpo policlonal anti SAA humano se inmovilizó en las partículas de látex de poliestireno.

2. Materiales y procedimientos

Las muestras de plasma bovino muestreadas con tiempo antes y después de la cirugía se midieron utilizando el reactivo de látex anterior con el analizador automático Hitachi 7170S (Hitachi High-Technologies). En concreto, se

mezclaron 2,0 µl de la muestra de plasma con 100 µl del primer reactivo (tampón HEPES 50 mM, pH 7,4), se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos, se añadieron 100 µl del segundo reactivo (una solución de látex inmovilizada con anticuerpos policlonales que contenía tampón HEPES 10 mM, pH 7,4), se dejó que la reacción continuara a 37°C y se midieron los cambios en la absorbancia a la doble longitud de onda de 800/570 nm (sub-longitud de onda/longitud de onda principal) durante aproximadamente 5 minutos después de añadir el segundo reactivo.

La concentración de SAA en las muestras de plasma se calculó a partir de la curva de calibración obtenida midiendo la muestra con concentración de SAA conocida.

3. Resultados

La concentración de SAA en las muestras de plasma bovino muestreadas con el tiempo antes y después de la cirugía fue de 0,62 a 1,72 mg/l, que estaba por debajo del intervalo de medición del reactivo de SAA preparado con el anticuerpo policlonal (5 a 500 mg/l) (Fig. 1).

4. Conclusiones

El reactivo de SAA preparado con el uso del anticuerpo policlonal anti SAA humano mostró baja reactividad con SAA bovino y, en consecuencia, no se pudo medir SAA bovino. Mientras que la SAA bovina podía medirse mediante EIA que implicaba el uso del anticuerpo policlonal descrito en el Ejemplo 1, no podía medirse mediante el inmunoensayo turbidimétrico de látex.

[Ejemplo 1] Cribado de anticuerpos monoclonales con muestras bovinas

1. Objetivo

Se cribó el anticuerpo monoclonal que reacciona con SAA bovina.

2. Materiales y procedimientos

Las muestras de plasma bovino muestreadas antes y después de la cirugía se inmovilizaron en una microplaca (inmovilización de antígeno), los anticuerpos policlonales anti SAA humano y los anticuerpos monoclonales anti SAA humano (Clones 14, 15, 17, 18, 21, y 25 mostrados en la Tabla 1 del Documento de Patente 3) se dejaron reaccionar con los mismos, y a continuación se examinó la reactividad mediante EIA en el que se dejó reaccionar el anticuerpo IgG anti-conejo marcado con POD o el anticuerpo IgG anti-rata marcado con POD.

3. Resultados

Con respecto a la reactividad con las muestras de plasma bovino a los 2 días después de la cirugía, la reactividad del Clon 18 fue la más alta, seguida del Clon 21, el Clon 15 y el anticuerpo policlonal en orden descendente, y no se observaron diferencias en la reactividad de otros clones antes y después de la cirugía (Fig. 2).

4. Conclusiones

Se confirmó que el anticuerpo policlonal anti SAA humano reaccionó con el plasma bovino mientras que el nivel de reacción era bajo y los anticuerpos monoclonales (Clon 17 y Clon 25) no reaccionaron con las muestras de plasma bovino en la fase aguda. Entre los anticuerpos monoclonales utilizados para el cribado, se identificaron 3 clones de anticuerpos monoclonales (Clon 18, Clon 21 y Clon 15) que reaccionarían con las muestras de plasma bovino en la fase aguda.

[Ejemplo 2] Preparación del reactivo para medir la SAA animal ("SAA-M") y medición de las muestras

1. Objetivo

Se examinaron los reactivos de látex para medir la SAA animal.

2. Materiales y procedimientos

Se prepararon reactivos de látex con el uso del anticuerpo monoclonal anti SAA humano (Clon 15) y partículas de látex de poliestireno de 130 nm de diámetro o de 220 nm y 80 nm de diámetro, y se midieron las series de dilución de muestras de suero con concentración de SAA conocida y muestras de suero de bovino, perro y gato. Como ejemplo comparativo, también se llevó a cabo la medición con la prueba LZ "Eiken" SAA (Eiken Chemical Corporation) disponible en el mercado.

El anticuerpo monoclonal anti SAA humano se inmovilizó en las partículas de látex de poliestireno de acuerdo con un procedimiento conocido. Específicamente, el anticuerpo monoclonal anti SAA humano se mezcló con látex de poliestireno, para permitir que el anticuerpo monoclonal anti SAA humano se adsorbiera físicamente en la superficie

del látex de poliestireno. Así, el anticuerpo monoclonal anti SAA humano se inmovilizó en las partículas de látex de poliestireno.

Las series de dilución de muestras de suero con concentración de SAA conocida (SAA humano) y muestras de suero bovino, canino y felino se midieron con el uso del analizador automático Hitachi 7170S (Hitachi High-Technologies). En concreto, se mezclaron 2,0 µl de la muestra de suero con 100 µl del primer reactivo (tampón HEPES 50 mM, pH 7,4), se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos, se añadieron 100 µl del segundo reactivo (una solución de látex inmovilizada con anticuerpo monoclonal que contenía tampón HEPES 10 mM, pH 7,4), se dejó que la reacción continuara a 37°C y se midieron los cambios en la absorbancia a la doble longitud de onda de 800/570 nm (sub-longitud de onda/longitud de onda principal) durante aproximadamente 5 minutos después de añadir el segundo reactivo.

La concentración de SAA en las muestras de suero de bovino, perro y gato se calculó a partir de la curva de calibración obtenida midiendo la muestra con concentración de SAA conocida.

3. Resultados

3-1. Preparación de reactivos con anticuerpos monoclonales

La Fig. 3 muestra los resultados de la medición de la serie de dilución de muestras de suero con concentración conocida de SAA (SAA humano) con el uso del reactivo de SAA que comprende partículas de látex de poliestireno de 130 nm de diámetro y el anticuerpo monoclonal (clon 15) inmovilizado sobre las mismas. Con el uso del reactivo SAA que comprende el Clon 15 inmovilizado en el mismo, se observó una fluctuación en los cambios de la absorbancia (Δ Abs) en la serie de dilución, obteniéndose así la curva de calibración.

El anticuerpo monoclonal (Clon 15) se inmovilizó en dos tipos de partículas de látex (es decir, partículas de 220 nm de diámetro y partículas de 80 nm de diámetro), y se preparó un reactivo de látex (SAA-M) que comprendía estos dos 2 tipos de partículas de látex a 2:1. La Fig. 4 muestra los resultados de la medición de la serie de dilución de muestras de suero con concentración conocida de SAA (curva de calibración).

3-2. Medición de muestras animales

La Fig. 5 muestra los resultados de la medición de las muestras de suero de bovino, perro y gato. La SAA en las muestras de bovino, perro y gato pudo medirse con el reactivo de látex (SAA-M) preparado inmovilizando el anticuerpo monoclonal (Clon 15) en dos tipos de partículas de látex (es decir, partículas de 220 nm de diámetro y partículas de 80 nm de diámetro). En cambio, con el uso de la prueba LZ "Eiken" SAA (LZ-SAA), el nivel de SAA de las muestras de suero de bovino y de perro estaba por debajo del rango de medición de la prueba LZ "Eiken" SAA; es decir, el nivel de SAA en las muestras de bovino y de perro no podía medirse con el uso de la prueba LZ "Eiken" SAA. En el caso de la muestra de perro, se observó una fluctuación mayor en comparación con el nivel medido con el uso de un reactivo disponible comercialmente para medir la PCR canina, y en la muestra de gato se observó una fluctuación mayor en comparación con los resultados obtenidos con el uso de la prueba LZ "Eiken" SAA.

4. Conclusiones

Con el uso del anticuerpo monoclonal (Clon 15) que se une a SAA reconociendo, como epítipo, una región en las proximidades de un residuo de aminoácido en la posición 90 desde el extremo N de la proteína SAA1 humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1, se pueden preparar reactivos de látex SAA que reaccionen con SAA obtenido de un bovino, un perro y un gato.

[Ejemplo 3] Medición de SAA en diversas muestras de animales

1. Objetivo

Si la SAA de diversas especies animales podría medirse o no con el uso del anticuerpo monoclonal (Clon 15) que se une a SAA reconociendo, como epítipo, se examinó una región en las proximidades de un residuo de aminoácido en la posición 90 desde el extremo N de la proteína SAA1 humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1.

2. Materiales y procedimientos

La SAA en diversas especies animales se midió usando el reactivo de látex que inmoviliza el anticuerpo monoclonal (Clon 15) (reactivo de SAA animal).

Como ejemplo comparativo, la medición se llevó a cabo de la misma manera con el uso del ensayo LZ "Eiken" SAA (LZ-SAA) descrito en el Ejemplo 2. Una especie animal (conejo) que no reaccionaría con la prueba LZ "Eiken" SAA

(LZ-SAA) se sometió a la medición de la CRP que se elevaría en caso de enfermedades inflamatorias como con SAA como referencia.

El reactivo SAA animal se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 2 excepto por el uso de partículas de látex de poliestireno de 215 nm de diámetro.

La SAA en diversas muestras animales se midió con el uso del analizador automático Hitachi 7170S (Hitachi High-Technologies). En concreto, se mezclaron 3,0 µl de cada una de las diversas muestras con 100 µl del primer reactivo (tampón HEPES 50 mM, pH 7,4), se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos, se añadieron 100 µl del segundo reactivo (una solución de látex inmovilizada con anticuerpos monoclonales que contenía tampón HEPES 10 mM, pH 7,4), se dejó que la reacción continuara a 37°C y se midieron los cambios en la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm durante aproximadamente 5 minutos después de añadir el segundo reactivo.

La concentración de SAA en diversas muestras animales se calculó a partir de la curva de calibración obtenida midiendo la muestra con concentración de SAA conocida.

3. Resultados

La Fig. 6 muestra los resultados de la medición.

Mientras que la SAA no pudo medirse en el ejemplo comparativo (la prueba LZ "Eiken" SAA) (por debajo de la sensibilidad de medición), la SAA en muestras obtenidas de diversos animales (es decir, un bovino, un caballo, un mono, un burro, una oveja, un cerdo, un ratón y un conejo) pudo medirse con el uso del reactivo SAA animal (el anticuerpo monoclonal (Clon 15) que se une a SAA reconociendo, como epítipo, una región en la vecindad de un residuo de aminoácido en la posición 90 desde el extremo N de la proteína SAA1 humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1; correspondiente al "reactivo para medir la SAA de acuerdo con la presente divulgación").

4. Conclusiones

Con el uso del reactivo SAA animal (el anticuerpo monoclonal (Clon 15)), puede medirse SAA en diversas especies animales.

[Ejemplo 4] Evaluación del reactivo SAA utilizando anticuerpos obtenidos de diversos clones

1. Objetivo

Los anticuerpos monoclonales obtenidos del Clon 18 y del Clon 21 se unen a SAA reconociendo, como epítipo, se examinó una región en las proximidades de un residuo de aminoácido en la posición 90 desde el extremo N de la proteína SAA1 humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 si era posible medir la SAA en diversas muestras animales como en el caso del anticuerpo monoclonal del Clon 15.

2. Materiales y procedimientos

Diversas muestras de suero animal obtenidas a partir de un humano, un gato, un perro, un caballo, un bovino, un mono, un capibara y un ratón se inmovilizaron en una microplaca (inmovilización de antígeno), se permitió que los anticuerpos monoclonales anti-SAA obtenidos a partir del Clon 15, el Clon 18 y el Clon 21 reaccionaran con los mismos, y a continuación se examinó la reactividad mediante EIA en el que se permitió que reaccionara el anticuerpo IgG anti-rata marcado con POD.

3. Resultados

Los resultados de la medición se muestran en la Fig. 7. Los símbolos "o" y "x" utilizados en la tabla de la Fig. 7 indican la presencia y la ausencia de la reacción (presencia: o, ausencia: x), respectivamente. Con respecto al "Valor corregido en blanco" que se muestra en la tabla de la Fig. 7, se determina que se ha producido la reacción (+) cuando el valor corregido en blanco es igual o superior a 0,020 teniendo en cuenta la dispersión.

Con el uso de "el anticuerpo monoclonal del Clon 18 que se une a SAA reconociendo, como epítipo, una región en las proximidades de un residuo de aminoácido en la posición 90 desde el extremo N de la proteína SAA1 humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 de acuerdo con la presente divulgación" y "el anticuerpo monoclonal del clon 21 que se une a SAA reconociendo, como epítipo, una región en las proximidades de un residuo de aminoácido en la posición 90 desde el extremo N de la proteína SAA1 humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 de acuerdo con la presente divulgación", la SAA en diversas muestras animales podría medirse como con el uso de "el anticuerpo monoclonal del Clon 15 que se une a la SAA reconociendo, como epítipo, una región en las proximidades de un residuo de aminoácido

en la posición 90 desde el extremo N de la proteína SAA1 humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 de acuerdo con la presente divulgación". Como se muestra en el gráfico de la Fig. 7, el coeficiente de correlación del Clon 18 con el Clon 15 fue de 0,982, y el del Clon 21 con el Clon 15 fue de 0,975.

5 4. Conclusiones

Se sugirió que el anticuerpo monoclonal del Clon 18 y el anticuerpo monoclonal del Clon 21 presentan propiedades equivalentes a las del anticuerpo monoclonal del Clon 15.

[Ejemplo 5] Cartografía epitópica de anticuerpos obtenidos a partir de diversos clones

1. Objetivo

10 Las secuencias de aminoácidos de la proteína SAA1 humana madura que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 a las que se unirían como epítomos los anticuerpos monoclonales obtenidos a partir del Clon 15, el Clon 18 y el Clon 21.

2. Materiales y procedimientos

15 Como se muestra en la Tabla 1 y la Fig. 8, se inmovilizaron péptidos derivados de la proteína SAA1 humana madura en portaobjetos de vidrio (inmovilización de antígeno) para preparar matrices.

Posteriormente, se permitió que los anticuerpos monoclonales anti-SAA obtenidos a partir del Clon 15, Clon 18 y Clon 21 reaccionaran con los péptidos de las matrices, y a continuación se permitió que el anticuerpo IgG de cabra anti-rata marcado con biotina reaccionara con los mismos. A continuación, se dejó que la estreptavidina marcada con fluorescencia reaccionara con las matrices y se examinó la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-SAA
20 frente a los péptidos.

[Tabla 1]

No.	Secuencia	Posiciones en SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:
Péptido # 1	HGAEDSLADQAANEWGRSGKDPNHF	71 a 95	2
Péptido # 2	HGAEDSLADQAANEW	71 a 85	3
Péptido # 3	GAEDSLADQAANEWG	72 a 86	4
Péptido # 4	AEDSLADQAANEWGR	73 a 87	5
Péptido # 5	EDSLADQAANEWGRS	74 a 88	6
Péptido # 6	DSLADQAANEWGRSG	75 a 89	7
Péptido # 7	SLADQAANEWGRSGK	76 a 90	8
Péptido # 8	LADQAANEWGRSGKD	77 a 91	9
Péptido # 9	ADQAANEWGRSGKDP	78 a 92	10
Péptido # 10	DQAANEWGRSGKDPN	79 a 93	11
Péptido # 11	QAANEWGRSGKDPNH	80 a 94	12
Péptido # 12	AANEWGRSGKDPNHF	81 a 95	13
Controles positivos			
Biotina-BSA			
IgG de rata (Raybiotech)			
Controles negativos			
0,1% BSA-PBS			

Los controles positivos mostrados en la Tabla 1 y la Fig. 8 son como se muestra a continuación:

25 Biotina-BSA: se inmovilizó BSA marcada con biotina en portaobjetos de vidrio en lugar de un péptido derivado de una proteína SAA1 humana madura; y

IgG de rata (Raybiotech): el anticuerpo IgG de cabra antirrata marcado con biotina se inmovilizó en portaobjetos de vidrio en lugar de un péptido derivado de una proteína SAA1 humana madura.

3. Resultados

Los resultados se muestran en las Figs. 9 y 10.

Como se muestra en las Figs. 9 y 10, se comprobó que los anticuerpos monoclonales anti-SAA obtenidos a partir del Clon 15, Clon 18 y Clon 21 se unían suficientemente a los Péptidos #7 a #11.

5 4. Conclusiones

Los anticuerpos monoclonales anti-SAA obtenidos a partir del Clon 15, Clon 18 y Clon 21 se unieron suficientemente a los péptidos #7 a #11. En consecuencia, se sugirió que dichos anticuerpos se unen a la proteína SAA1 humana madura reconociendo, como epítipo, la secuencia de aminoácidos común entre los péptidos #7 a #11 (QAANEWGRSGK: SEQ ID NO: 14) (Fig. 10C). Dicho epítipo corresponde a una secuencia de aminoácidos en las

10 posiciones 80^a a 90^a desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para medir inmunológicamente el amiloide sérico A que comprende un paso para medir el amiloide sérico A utilizando un reactivo para medir el amiloide sérico A de una pluralidad de especies animales, comprendiendo dicho reactivo un anticuerpo monoclonal anti-amiloide sérico A de reactividad cruzada con especies animales o un
5 fragmento del mismo,
- en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-amiloide A de reactividad cruzada con especies animales o un fragmento del mismo se une específicamente, como epítipo de la proteína amiloide A del suero, a los residuos de aminoácidos en las posiciones 80ª a 90ª desde el extremo N de la proteína amiloide A1 del suero humano maduro que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1,
- 10 en el que dicho fragmento de anticuerpo monoclonal se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd y Fabc,
- en la que la pluralidad de especies animales son una pluralidad de especies animales seleccionadas del grupo que consiste en un humano, un bovino, un perro, un gato, un conejo, un caballo, un mono, un cerdo, una oveja, un burro y un ratón, y
- 15 en el que el procedimiento para la medición inmunológica es el inmunoensayo turbidimétrico de látex.

Fig. 1

Bovino	Duración	Muestra	Nivel de SAA medido (mg/L)
1	Antes de la cirugía	Plasma	0,76
	Cirugía	Plasma	0,62
	0 horas después del inicio de la cirugía	Plasma	0,63
	3 horas después del inicio de la cirugía	Plasma	0,62
	6 horas después del inicio de la cirugía	Plasma	0,94
	9 horas después del inicio de la cirugía	Plasma	1,32
	1 día después de la cirugía	Plasma	1,62
	2 días después de la cirugía	Plasma	1,72
	3 días después de la cirugía	Plasma	1,67
	4 días después de la cirugía	Plasma	1,57
	5 días después de la cirugía	Plasma	1,66
	6 días después de la cirugía	Plasma	1,59
	7 días después de la cirugía	Plasma	1,60
	14 días después de la cirugía	Plasma	1,06
	21 días después de la cirugía	Plasma	1,09

Fig. 2

Bovino 1	Anticuerpo policlonal	Anticuerpo monoclonal					
		Clon 17	Clon 14	Clon 15	Clon 18	Clon 21	Clon 25
Resultados de medición (Aus)							
Prueba en blanco de reactivo	0.0155	0.0050	0.6990	0.0075	0.0055	0.0070	0.0200
Antes de la cirugía	0.0740	0.0100	0.8885	0.0515	0.1450	0.1295	0.0890
2 días después de la cirugía	0.3805	0.0110	0.7220	0.6180	0.9665	0.8940	0.0805
21 días después de la cirugía	0.0970	0.0145	0.7420	0.0860	0.2360	0.1925	0.0885
Resultados de la medición - Prueba en blanco con reactivos (ΔAbs)							
Prueba en blanco con reactivos	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Antes de la cirugía	0.0585	0.0050	0.1895	0.0440	0.1395	0.1225	0.0690
2 días después de la cirugía	0.3650	0.0060	0.0230	0.5105	0.9610	0.8870	0.0605
21 días después de la cirugía	0.0815	0.0095	0.0430	0.0785	0.2305	0.1855	0.0685

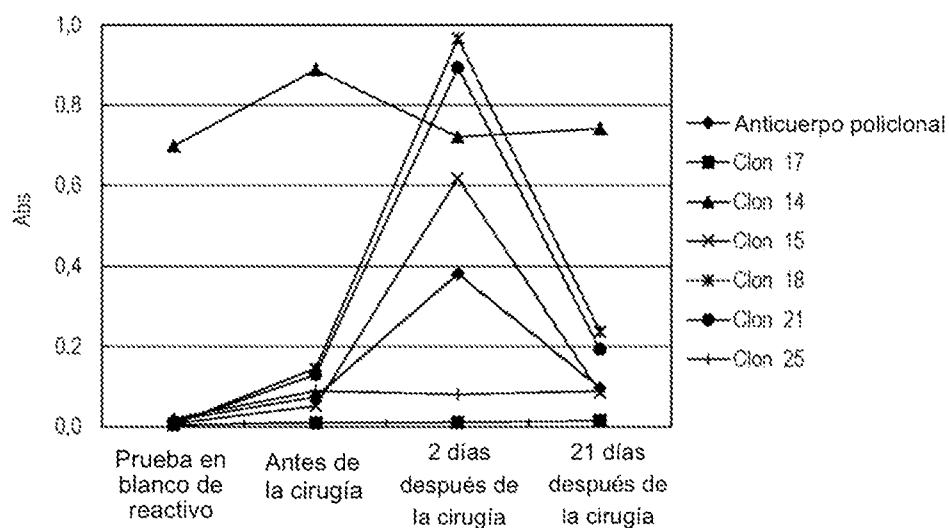


Fig. 3

Clon	Clon 15
Concentración de látex	0,10%
Concentración de SAA (mg/L)	
0	-29
10	-20
50	128
150	864
300	2312
500	3864

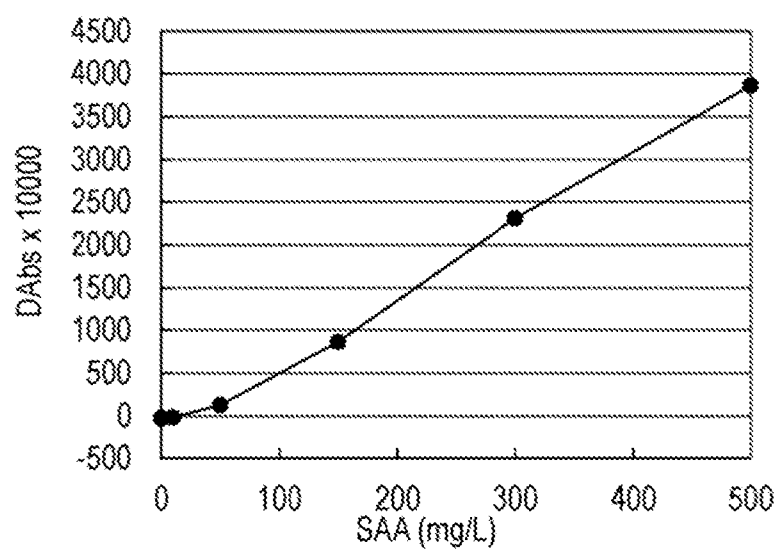
Unit: $\Delta\text{Abs} \times 10000$ 

Fig. 4

Estandar (mg/L)	SAA-M (Δ Abs*)
0	-10
0	-8
10	108
10	106
50	729
50	772
150	1743
150	1744
300	2701
300	2705
500	3615
500	3678

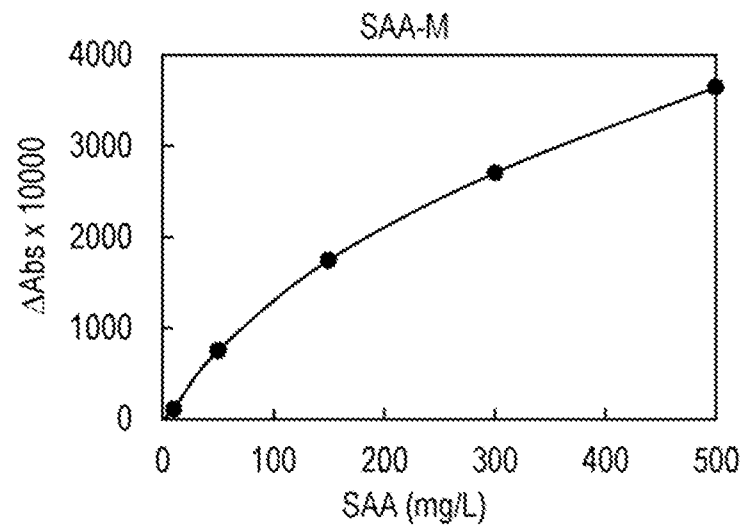
*: Δ Abs x 10000

Fig. 5

Especie animal	Muestra No.	Referencia (PCR)		Nivel de SAA medido	
		PCR canina	PCR humana	LZ-SAA	SAA-M
		mg/dL	mg/dL	mg/L	mg/L
Bovino	1			0,9	23,2
	2		0,00	2,3	172,9
Perro	1	0,00	3,97	0,9	191,8
	2	0,10	0,00	0,3	1,0
	3	0,00	0,01	0,4	0,7
	4	0,20	0,00	0,4	0,4
	5	0,15	0,00	0,3	0,6
	6	OR	3,59	1,0	101,5
	7	9,40	4,02	1,1	299,6
	8	5,50	3,85	1,1	186,8
	9	9,40	3,98	1,1	5,9
	10	3,65	1,82	0,8	19,5
	11	8,00	4,11	1,3	132,4
	12	5,00	3,80	1,1	98,2
	13	4,80	3,54	0,6	41,5
	14	12,00	3,94	1,5	185,4
	15	7,80	4,12	0,7	778,2
	16	12,00	3,76	1,1	47,1
	17		0,00	1,1	55,6
	18		3,87	0,9	584,7
	19		4,19	1,0	142,8
	20		3,67	1,5	236,1
Gato	1		0,00	0,5	4,5
	2		0,00	0,6	3,1
	3		0,00	0,5	2,8
	4		0,01	0,7	5,3
	5		0,00	1,0	21,7
	6		0,01	70,3	255,4
	7		0,00	76,1	473,4
	8		0,00	75,3	441,2
	9		0,00	7,1	315,7
	10		0,00	12,6	447,3
	11		0,00	13,4	314,5
	12		0,00	10,2	304,8
	13		0,00	57,3	668,2
	14		0,00	91,4	710,3
	15		0,00	105,9	367,2

El blanco: No se realizó la medición.

Fig. 6

Especie animal	Muestra No.	Reactivo SAA animal (mg/L)	Comp. E _j * (LZ-SAA) (mg/L)	Ref. E _j (CRP) (mg/L)	Especie animal	Muestra No.	Reactivo SAA animal (mg/L)	Comp. E _j * (LZ-SAA) (mg/L)	Ref. E _j (CRP) (mg/L)
Bovino	1	42.9	2.1		Mono	1	0.8	0.0	
	2	138.8	0.8			2	1.5	0.2	
	3	11.9	1.2			3	7.6	0.8	
	4	49.7	1.1			4	22.1	1.2	
	5	92.7	1.2			5	15.0	0.8	
	6	48.0	1.3			6	20.3	8.6	
	7	40.8	0.0			7	1180.5	0.1	
	8	174.1	0.0			8	198.5	1.6	
	9	61.6	0.0			9	1.4	0.0	
	10	12.6	0.0			10	0.6	0.0	
	11	28.2	0.0			11	0.9	0.0	
	12	40.7	0.0			12	30.0	13.4	
	13	111.9	0.0			13	3.0	0.0	
	14	138.8	0.0		Asno		6.5	0.0	
	15	28.9	0.7				0.1	0.7	
	16	6.5	0.4		Cerdo		2.6	0.0	
Caballo	1	3.5	3.0		Capibara	1	0.6	0.0	
	2	23.3	7.5			2	0.9	0.0	
	3	3.1	1.8		Ratón	1	0.6	0.0	
	4	0.0	2.0			4	2.4	1.0	
	5	16.1	11.5			3	1.3	0.0	
	6	4.8	0.8			2	0.9	0.0	
	7	2.1	1.5			5	0.5	0.0	
	8	1.8	0.0			6	1.0	0.0	
	9	4257.4	3624.9		Conejo	1	1.7		0.3
	10	223.2	293.6			2	25.5		56.7
	11	56.3	85.2			3	18.1		97.6
	12	2055.0	1804.8			4	613.7		53.5
	13	352.9	394.6			5	28.3		57.0
	14	87.0	78.7			6	0.0		7.1
	15	60.8	72.0			7	7.9		14.6
	16	45.7	44.2			8	52.5		10.1
	17	109.3	153.4			9	62.2		77.2
	18	199.5	251.0			10	19.0		71.6
	19	75.3	72.5			11	349.5		213.4
	20	3791.1	5492.7			12	10.0		8.3

*Comp. E_j (LZ test "Eiken" SAA)

El blanco: No se realizó la medición.

Fig. 7

	Reactivo SAA animal	Reactivo LZ-SAA	Clon 15		Clon 18		Clon 21	
			Resultados de medición (Abs.)	Valor corregido en blanco	Resultados de medición (Abs.)	Valor corregido en blanco	Resultados de medición (Abs.)	Valor corregido en blanco
Prueba en blanco (n = 3, media)	-	-	0,008	-	0,084	-	0,092	-
Humano	A	○	1,097	1,097	1,477	1,477	1,587	1,587
	B	○	1,158	1,158	1,592	1,592	1,557	1,557
Gato	A	○	0,400	0,400	0,566	0,566	0,649	0,649
	B	○	1,024	1,024	1,280	1,280	1,321	1,321
Perro	A	○	0,506	0,506	0,795	0,795	0,915	0,915
	B	○	0,634	0,634	1,243	1,243	1,297	1,297
Caballo	A	○	0,786	0,786	1,168	1,168	1,220	1,220
	B	○	0,271	0,271	0,422	0,422	0,448	0,448
Bovino	A	○	1,753	1,753	2,011	2,011	2,092	2,092
	B	○	0,318	0,318	0,791	0,791	0,843	0,843
Mono	A	○	0,606	0,606	0,970	0,970	1,025	1,025
	B	○	0,323	0,323	0,496	0,496	0,512	0,512
	C	○	0,918	0,918	1,325	1,325	1,462	1,462
	D	○	0,348	0,348	0,548	0,548	0,616	0,616
	E	○	0,690	0,690	0,978	0,978	1,021	1,021
	F	○	0,671	0,671	0,975	0,975	1,065	1,065
Capibara	A	○	0,079	0,079	0,121	0,121	0,120	0,120
Ratón	A	○	1,892	1,892	2,204	2,204	2,168	2,168
	B	○	0,073	0,073	0,365	0,365	0,390	0,390

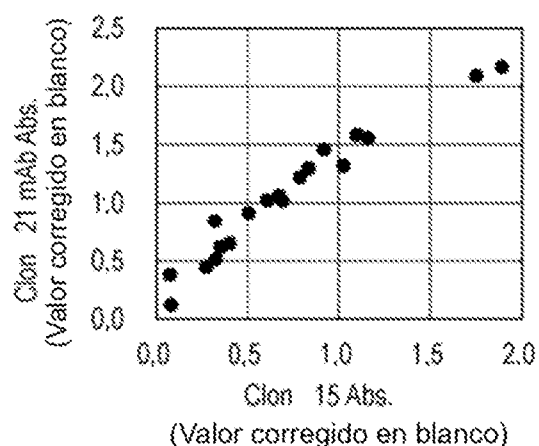
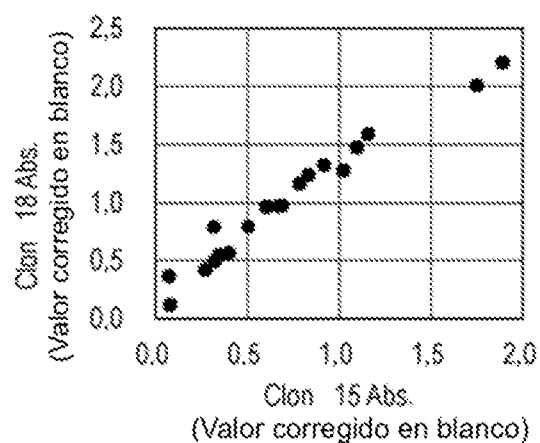


Fig. 8

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Biotina- BSA	Biotina- BSA	Biotina- BSA	#5	#5	#5	IgG de rata (Raybio)	IgG de rata (Raybio)	IgG de rata (Raybio)
2	Biotina BSA	Biotina BSA	Biotina BSA	#6	#6	#6			
3	#1	#1	#1	#7	#7	#7	#11	#11	#11
4	#2	#2	#2	#8	#8	#8	#12	#12	#12
5	#3	#3	#3	#9	#9	#9	0,1% BSA-PBS	0,1% BSA-PBS	0,1% BSA-PBS
6	#4	#4	#4	#10	#10	#10	Biotina- BSA	Biotina- BSA	Biotina- BSA

Fig. 9

Señal a ruido						
Nombre del objetivo	15 50 μ g/mL	15 50 μ g/mL	18 50 μ g/mL	18 50 μ g/mL	21 50 μ g/mL	21 50 μ g/mL
	Sin fondo	Sin fondo	Sin fondo	Sin fondo	Sin fondo	Sin fondo
POS	136809,21	136809,21	136809,21	136809,21	136809,21	136809,21
#1	671,82	1422,39	915,90	1330,47	810,13	1255,83
#2	5,57	7,65	7,39	7,42	7,85	8,82
#3	0,18	0,18	0,42	0,49	0,30	0,33
#4	0,02	0,50	0,77	1,92	0,16	0,37
#5	2,00	4,78	8,24	12,02	1,49	4,92
#6	2,15	4,30	8,17	15,03	1,54	2,43
#7	757,19	1155,59	425,54	928,40	323,44	935,53
#8	822,75	1548,83	738,62	1143,15	673,33	1380,64
#9	325,52	394,50	306,34	550,46	371,41	630,65
#10	374,18	599,71	374,32	509,00	470,01	805,49
#11	40,74	54,10	104,97	148,58	65,94	99,02
#12	0,32	2,21	0,58	2,29	0,24	0,28

Fig. 10

