

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2002.12.19	(73) Titular(es): VSL PHARMACEUTICALS, INC. 800 SOUTH FREDERICK AVENUE GAITHERSBURG, MD 20877 US
(30) Prioridade(s): 2001.12.21 IE 20011100	
(43) Data de publicação do pedido: 2004.09.15	
(45) Data e BPI da concessão: 2013.12.23 006/2014	(72) Inventor(es): CLAUDIO DE SIMONE IT
	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, N.º. 69 - 3.º D 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO E KIT PARA DETECÇÃO DE ESFINGOMIELINASE ALCALINA**

(57) Resumo:

DESCREVE-SE UM MÉTODO ANALÍTICO FLUOROMÉTRICO E UM KIT PARA UTILIZAÇÃO NESSE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE ESFINGOMIELINASE ALCALINA (SMASE) NAS FEZES DE UM DOENTE NECESSITADO DESSA DETERMINAÇÃO UMA VEZ QUE A SMASE ALCALINA É UM MARCADOR DE ESTADOS PATOLÓGICOS GRAVES, COMO O CANCRO DO CÓLON.

RESUMO

"MÉTODO E KIT PARA DETECÇÃO DE ESFINGOMIELINASE ALCALINA"

Descreve-se um método analítico fluorométrico e um kit para utilização nesse método para determinação da presença de esfingomielinase alcalina (SMase) nas fezes de um doente necessitado dessa determinação uma vez que a SMase alcalina é um marcador de estados patológicos graves, como o cancro do cólon.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO E KIT PARA DETECÇÃO DE ESFINGOMIELINASE ALCALINA"

A presente invenção refere-se a um método analítico para determinar a presença de esfingomielinase alcalina nas fezes ou fluidos biológicos de doentes que necessitam dessa determinação. A invenção também se refere a um kit para a realização do método analítico.

Mais particularmente, o método da presente invenção é um método fluorométrico *in vitro* para detecção de esfingomielinase alcalina que, como será aqui escrito em pormenor adiante, é um marcador de estados patológicos graves, tais como cancro do cólon e polipose adenomatosa familiar.

A enzima esfingomielinase (esfingomielina fosfodiesterase, SMase) catalisa a hidrólise de esfingomielina a ceramida e fosfato de colina.

Até à data foram identificados três tipos diferentes de SMase (acídica, neutra e alcalina), que ocorrem como várias iso-formas, como se segue:

- SMase acídica lisossomal (A-SMase);
- SMase acídica dependente de Zn^{2+} citossólica;
- SMase neutra dependente de magnésio de membrana (N-SMase);
- N-SMase independente de magnésio citossólica; e

- SMase alcalina.

Demonstrou-se que as SMases desempenham um papel numa grande variedade de processos fisiológicos e patológicos, incluindo: hidrólise lisossomal de SM endocitosada, sinalização celular mediada por ceramida, aterogénese, diferenciação terminal, paragem dos ciclos celulares, apoptose, inflamação e a regulação de respostas aos stresses eucarióticos.

Em contraste com a SMase acídica e neutra, que estão actualmente presentes em células como enzimas lisossomais e ligadas à membrana, respectivamente, a SMase alcalina apresenta diferença em tecidos e espécies. Em seres humanos, a SMase alcalina encontra-se na mucosa intestinal e biliar. A SMase alcalina inicialmente surge no duodeno, atinge um nível elevado no intestino, especialmente na parte distal do jejuno e ocorre em quantidades consideráveis no cólon e recto. Esta SMase apresenta pH alcalino óptimo a 9,0, é independente de Mg^{2+} , dependente de sais biliares e resistente à tripsina.

A importância patológica da SMase alcalina só foi recentemente reconhecida e isto prontificou que fossem realizados vários estudos, sobretudo pelas razões seguintes.

Em primeiro lugar, a enzima pode ser responsável pela hidrólise da esfingomielina dietética que ocorre substancialmente no leite, ovos, carne e peixe. Em segundo lugar, esta enzima pode regular a absorção do colesterol. Em terceiro lugar, a presença de SMase alcalina ao longo do tracto intestinal e a sua diminuição selectiva detectada no carcinoma colorrectal sugere que esta enzima desempenha um papel na carcinogénese intestinal, uma vez que em condições fisiológicas, estimula a apoptose e protege a mucosa intestinal contra a

carcinogénese.

Estudos anteriores também demonstraram que, em condições fisiológicas, a SMase alcalina é dissociada por sais biliares da membrana mucosa intestinal para o lúmen. Contudo, em estados patológicos, em que a concentração de sais biliares está anormalmente aumentada, a dissociação da SMase alcalina por sais biliares pode exceder a biossíntese da enzima, resultando num baixo nível de actividade da SMase alcalina na mucosa e numa excreção da enzima anormalmente aumentada nas fezes ou em fluidos biológicos, i. e., bÍlis. Consequentemente, o excesso de SMase alcalina excretado nas fezes ou em fluidos biológicos em relação aos valores basais normais pode ser interpretado como um marcador de diagnóstico valioso para carcinoma colorrectal e polipose adenomatosa familiar, e daqui a necessidade de um ensaio fiável para detectar SMase alcalina nas fezes ou em fluidos biológicos de doentes com probabilidade de estarem a sofrer das patologias anteriormente referidas do tracto intestinal.

Além disso, algumas estirpes de bactérias (e. g., *Streptococcus termophilus*, *Lactobacilli*) contêm níveis elevados de SMase e a determinação de SMase alcalina pode proporcionar um método de avaliar alterações do número das referidas bactérias, i. e., após um tratamento com probióticos e/ou produtos à base de probióticos.

Já são conhecidos métodos anteriores para dosear SMase alcalina. A actividade das SMases pode ser determinada *in vivo* através de células marcadas com um precursor radioactivo de SM e depois determinado os níveis do produto marcado ou *in vitro* utilizando SM radiomarcada ou um análogo acromogénico de SM ou derivados corados e fluorescentes de SM neutra.

Estes ensaios conhecidos, vulgarmente utilizados, não são inteiramente satisfatórios uma vez que são potencialmente muito perigosos na medida em que são ensaios radioactivos e menos sensíveis do que um ensaio fluorométrico.

Um objectivo da presente invenção é proporcionar um ensaio fiável e barato para SMase alcalina nas fezes ou fluidos biológicos de doentes com probabilidade de sofrer de carcinoma colorrectal e polipose adenomatosa familiar, ou doenças da vesícula biliar ou do fígado, que superem as desvantagens dos métodos conhecidos.

Um objectivo adicional da presente invenção é proporcionar um kit analítico para utilização no ensaio anteriormente referido.

Outro objectivo da presente invenção é a determinação da colonização bacteriana em diferentes estados de saúde ou após doenças ou tratamento com fármacos ou probióticos ou suplementos alimentares.

O método de ensaio indirecto, fluorométrico da presente invenção baseia-se na seguinte sequência de reacções.

Sob a acção de SMase alcalina, presente em fezes ou outros fluidos biológicos, a esfingomiéline é hidrolisada a ceramida e fosforilcolina a qual, sob a acção de fosfatase alcalina, é hidrolisada dando colina. Na presença de colina oxidase, a colina produz peróxido de hidrogénio (H_2O_2).

Este último composto, na presença de peroxidase de rábano, reage com 10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina, uma sonda fluorogénica sensível para H_2O_2 (daqui em diante referida como

"Reagente Vermelho Amplex") dando o composto altamente fluorescente resorufina. A fluorescência é medida com um fluorímetro de microplaca de fluorocontagem utilizando excitação a 530-560 nm e detecção da fluorescência a 590 nm.

Com base na sequência de reacções acima referida e meios de detecção da fluorescência, o método de ensaio da presente invenção para determinação de SMase alcalina compreende os seguintes passos, que se referem a fezes. Contudo, será evidente para um especialista na matéria que este método pode ser facilmente aplicado também a fluidos biológicos, tais como bÍlis com variações de rotina apropriadas,

1) recolher uma amostra de fezes de um doente e proceder à sua secagem;

2) pesar cerca de 3-4 gramas da amostra seca e suspendê-la em 20 mL de um tampão de homogeneização contendo sacarose 0,25 M, KCl 0,15 M, KH_2PO_4 50 mM, pH 7,4;

3) centrifugar a amostra a 4000 rpm a +4 °C durante 60 min;

4) recuperar o sobrenadante e centrifugar de novo durante 15 min a 4000 rpm a +4 °C;

5) medir o teor de proteína no sobrenadante pelo método de Pierce com albumina de soro bovino como padrão utilizando para cada amostra uma gama de concentrações de proteína entre 32 mg/mL e 40 mg/mL e pipetando 25 µL de cada amostra para o poço;

6) adicionar a cada amostra de 25 µL, 65 µL de tampão de ensaio contendo Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,15 pH 9,0 e

10 μL de esfingomielina 29 μM e ao tampão de ensaio adicionar sais biliares (TC, TDC, GC, GCDC) na concentração de 3 mM;

7) incubar a 37 °C durante 1 h;

8) pipetar 100 μL de cada padrão (ver adiante) e 10 μL de esfingomielina (29 μM), incubando durante 1 h a 37 °C como as amostras;

9) após 1 hora, adicionar 100 μL de tampão de reacção contendo Tris/HCl 50 mM pH 7,4, β -glicerofosfato 10 mM, ATP 750 μM , EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, Vermelho Amplex 100 μM , fosfatase alcalina a 8 U/mL, colina oxidase a 0,2 U/mL, peroxidase de rábano a 2 U/mL;

10) incubar as reacções durante 1 hora ou mais a 37 °C, protegidas da luz;

11) medir a fluorescência num leitor de microplacas de fluorescência utilizando excitação na gama de 530-560 nm e detecção da emissão a 590 nm;

12) para cada ponto, corrigir quanto à fluorescência de fundo por subtracção dos valores provenientes do controlo sem esfingomielinase.

A invenção também se relaciona com um kit para detecção de esfingomielinase alcalina nas fezes ou fluidos biológicos de um doente de acordo com o método descrito acima, que compreende tubos de ensaio contendo separadamente amostras dos seguintes reagentes:

a) esfingomielina a ser hidrolisada por esfingomielinase alcalina presente nas fezes ou fluidos biológicos, para dar fosforilcolina;

b) fosfatase alcalina para catalisar a hidrólise de fosforilcolina a colina;

c) colina oxidase para oxidar a colina a peróxido de hidrogénio;

d) peroxidase de rábano para ajudar a reacção de peróxido de hidrogénio com

e) Reagente Vermelho Ampler (10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina) para dar o composto fluorescente resorufina cuja fluorescência é um marcador da SMase alcalina presente nas fezes ou fluidos biológicos; e

f) esfingomielinase bacteriana liofilizada para utilização como concentrado padrão.

Para que o método analítico da presente invenção seja adequadamente realizado, além dos componentes do kit anteriormente referidos, são necessários mais os seguintes materiais e equipamentos:

Sacarose;

Cloreto de potássio (KCl);

Fosfato de potássio, monobásico (KH_2PO_4);

Base Trizma;

EDTA;

Cloreto de sódio;

Taurocolato (TC);

Taurodesoxicolato (TDC);
Glicocolato (GC);
Glicoquenodesoxicolato (GCDC);
 β -Glicerofosfato;
Sal dissódico de ATP;
EGTA;
Reagente de Ensaio de Proteína BCA;
Albumina de soro bovino;
Uma centrífuga refrigerada;
Um leitor de microplacas capaz de medir a 550-562 nm, e
Um fluorímetro de microplacas de fluorocontagem.

Para efectuar a quantificação da actividade de SMase, devem ser feitas as seguintes determinações.

Preparação da Curva Padrão

O kit é fornecido com uma preparação padrão de SMase, que consiste em extracto bacteriano contendo um tipo de SMase que actua a pH 9. Devem ser realizadas as operações seguintes.

Construir uma curva de calibração de SMase: diluir o concentrado padrão para fazer diluições em série.

Reconstituir o padrão de SMase com 1 mL de tampão de ensaio (pH 9,0); esta reconstituição produz uma solução mãe de 96 mU/mL.

Pipetar 0,500 mL de tampão de ensaio para cada tubo. Utilizar a solução mãe para produzir diluições em série. Misturar cada tubo muito bem antes da transferência seguinte. O padrão não diluído serve como o padrão elevado (96 mU/mL), e a

curva padrão vai conter as seguintes concentrações (mU/mL): 96-48-24-12-6-3. O tampão serve como o padrão zero (0 mU/mL).

Curvas Padrão Típicas

Na Figura 1 está apresentada a curva padrão apenas para demonstração. Deve ser construída uma curva padrão para cada conjunto de amostras ensaiadas.

Cálculo dos Resultados

Determinar a média de leitura em duplicado para cada padrão e amostra e subtrair a fluorescência média do padrão zero.

Construir o gráfico da fluorescência dos padrões em função da actividade (mU/mL) dos padrões e traçar a melhor curva. Para determinar a actividade de SMase de cada amostra, primeiro procurar o valor de fluorescência no eixo de y e prolongar uma linha horizontal até à curva padrão. No ponto de intersecção, prolongar uma linha vertical para o eixo de x e ler a correspondente actividade de SMase.

O método descrito é capaz de determinar a actividade de SMase *in vitro*; foi desenvolvido com o objectivo de detectar SMase alcalina numa amostra orgânica.

Para determinar especificamente a SMase alcalina o método utiliza condições que detectam a actividade de SMases ácida e neutra. De facto:

- o tampão de homogeneização tem um pH neutro, mas não tem

inibidores de protease e fosfatase para excluir a SMase neutra uma vez que esta última é sensível a actividades de proteases e fosfatases e é consequentemente inibida por estas enzimas;

- no tampão de homogeneização está ausente $MgCl_2$ para bloquear a actividade de SMase neutra dependente de Mg;

- o tampão de reacção contém β -glicerofosfato e ATP para excluir ainda actividade de SMase ácida a pH neutro, neste tampão estão presentes EDTA e EGTA em concentração elevada para inibir SMase neutra.

Lisboa, 06.11.1999

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detecção *in vitro* de esfingomielinase alcalina numa amostra de material biológico de um doente, compreendendo os passos de
 - a) suspender a amostra num tampão de homogeneização contendo sacarose 0,24-0,26 M, KCl 0,14-0,16 M, KH_2PO_4 45-55 mM, ajustado para pH 7,4;
 - b) centrifugar a amostra, pelo menos, uma vez e recuperar o sobrenadante;
 - c) medir o teor de proteína no sobrenadante;
 - d) adicionar a uma amostra do sobrenadante um tampão de ensaio contendo Tris/HCl 44-55 mM, EDTA 1,9-2,2 mM, NaCl 0,14-0,16 M, pH 8,9-9,1 e esfingomielina 28-31 μM e um tampão de ensaio contendo os sais biliares TC, TDC, GC, GCDC na concentração de 2,9-3,1 mM;
 - e) incubar a mistura de ensaio a 37 °C durante cerca de 1 h;
 - f) misturar a amostra do passo d) com esfingomielina 29-30 μM e incubar durante cerca de 1 h a cerca de 37 °C;
 - g) adicionar tampão de reacção contendo Tris/HCl 45-55 mM pH 7,4, β -glicerofosfato 9-11 mM, ATP 745-755 μM , EDTA 4-6 mM, EGTA 4-6 mM, reagente Vermelho Amplex 95-105 μM , fosfatase alcalina a 7-9 U/mL, colina oxidase a 0,1-0,3 U/mL, peroxidase de rábano a 1,5-2,5 U/mL;

- h) incubar a mistura reaccional durante, pelo menos, 1 hora a cerca de 37 °C, protegida da luz;
 - i) medir a fluorescência utilizando excitação na gama de 530-560 nm e detecção da emissão a cerca de 590 nm.
2. Método como reivindicado na reivindicação 1, em que para cada amostra, a leitura de fluorescência é corrigida da fluorescência de fundo por subtração dos valores derivados de um controlo sem esfingomielinase.
 3. Método como reivindicado na reivindicação 1 ou 2, em que o teor de proteína é determinado pelo método de Pierce.
 4. Método como reivindicado na reivindicação 1, em que o material biológico é fezes de um doente, compreendendo o referido método os seguintes passos:
 - a) secar uma amostra de fezes de um doente;
 - b) pesar cerca de 3-4 gramas da amostra seca e suspendê-la em 20 mL de um tampão de homogeneização contendo sacarose 0,25 M, KCl 0,15 M, KH_2PO_4 50 mM, pH 7,4;
 - c) centrifugar a amostra a 4000 rpm a +4 °C durante 60 min;
 - d) recuperar o sobrenadante e centrifugar de novo durante 15 min a 4000 rpm a +4 °C;
 - e) medir o teor de proteína no sobrenadante pelo método de Pierce com albumina de soro bovino como padrão utilizando para cada amostra uma gama de concentrações de proteína

entre 32 mg/mL e 40 mg/mL e pipetando 25 µL de cada amostra para o poço;

f) adicionar a cada amostra de 25 µL, 65 µL de tampão de ensaio contendo Tris/HCl 50 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0,15 M pH 9,0 e 10 µL de esfingomielina 29 µM e em tampão de ensaio adicionar sais biliares (TC, TDC, GC, GCDC) na concentração de 3 mM;

g) incubar a 37 °C durante 1 h;

h) pipetar 100 µL de cada esfingomielinase bacteriana liofilizada padrão e 10 µL de esfingomielina 29 µM, incubando durante 1 h a 37 °C como as amostras;

e) após 1 hora, adicionar 100 µL de tampão de reacção contendo Tris/HCl 50 mM pH 7,4, β-glicerofosfato 10 mM, ATP 750 µM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, Vermelho Amplex 100 µM, fosfatase alcalina a 8 U/mL, colina oxidase a 0,2 U/mL, peroxidase de rábano a 2 U/mL;

l) incubar as reacções durante 1 hora ou mais a 37 °C, protegidas da luz;

m) medir a fluorescência num leitor de microplacas de fluorescência utilizando excitação na gama de 530-560 nm e detecção da emissão a cerca de 590 nm;

n) para cada ponto, corrigir quanto à fluorescência de fundo por subtracção dos valores provenientes de um controlo sem esfingomielinase.

5. Método da reivindicação 4, aplicado a fluidos biológicos.

6. Kit para detecção de esfingomielinase alcalina num material biológico de um doente, que compreende tubos de ensaio contendo separadamente amostras dos seguintes reagentes:
- a) esfingomielina a ser hidrolisada por esfingomielinase alcalina presente nas fezes ou fluidos biológicos, para dar fosforilcolina;
 - b) fosfatase alcalina para catalisar a hidrólise de fosforilcolina a colina;
 - c) colina oxidase para oxidar a colina a peróxido de hidrogénio;
 - d) peroxidase de rábano para ajudar a reacção de peróxido de hidrogénio com
 - e) Reagente Vermelho Amplex (10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina) para dar o composto fluorescente resorufina cuja fluorescência é um marcador da esfingomielinase alcalina presente nas fezes ou fluidos biológicos; e
 - f) esfingomielinase bacteriana liofilizada para utilização como concentrado padrão;
 - g) um tampão de ensaio a pH 8,9-9,1 que contém EDTA;
 - h) sais biliares TD, TDC, GC, GCDC;
 - i) um tampão de reacção contendo EDTA e EGTA, β -glicerofosfato e ATP.

Lisboa, 06.11.2009

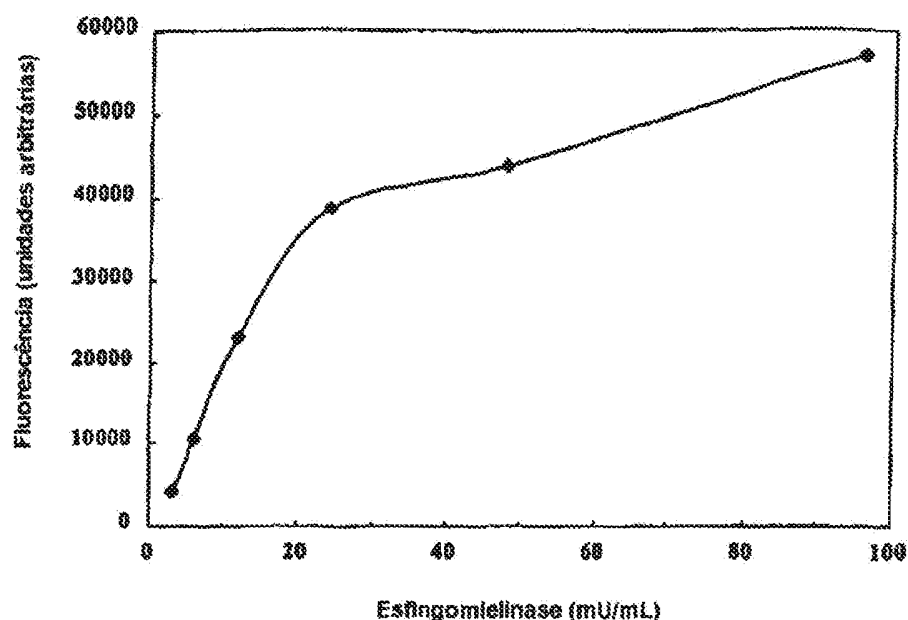


Figura 1: Detecção de esfingomielinase utilizando o ensaio de fluorescência

Cada reacção continha a quantidade indicada de esfingomielinase bacteriana em tampão de ensaio específico.

As reacções foram incubadas a 37 °C durante uma hora. A fluorescência foi medida com um leitor de microplacas de fluorescência utilizando excitação a 530 nm e detecção de fluorescência a 590 nm.