



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 941**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03741878 .7**

96 Fecha de presentación : **04.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1549759**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **Método de prueba bacteriana para enzimas glicadas intracelulares.**

30 Prioridad: **12.06.2002 US 170133**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.09.2010

73 Titular/es:
SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS Inc.
511 Benedict Avenue
Tarrytown, New York 10591, US

72 Inventor/es: **Pugia, Michael, J.;**
Basu, Manju;
Hatch, Robert, P. y
Profitt, James, A.

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

ES 2 344 941 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de prueba bacteriana para enzimas glicadas intracelulares.

5 **Antecedentes de la invención**

Esta invención se relaciona en general con métodos para detectar bacterias en fluidos, particularmente en especímenes biológicos. Mas específicamente, la invención se relaciona con métodos rápidos para la detección de bacterias en orina y otros fluidos con mejorada precisión comparados con aquellos actualmente disponibles. Aunque el análisis de orina es de particular interés, otros fluidos, tales como sangre, suero, agua, y similares pueden ser analizados usando los métodos de la invención.

Es deseable una prueba rápida para bacterias, por ejemplo usando tiras de prueba secas del tipo ahora usado para diversos propósitos. En la actualidad, las tiras de prueba de orina son usadas para explorar muestras y descartar aquellas que no requieren evaluación de laboratorio. Sin embargo, las pruebas actuales, tales como medición de nitritos y leucocitos, no son capaces de proveer rápidamente resultados certeros. A menudo, se obtienen muchos resultados falsos, haciendo innecesarios análisis de seguimiento de laboratorio. Aproximadamente 50% de la carga de trabajo del laboratorio de un hospital involucra especímenes de orina y aproximadamente 90% de estos especímenes son cultivados y analizados para bacterias totales y gran negativas. Sin embargo, sólo aproximadamente 10% de las muestras de orina que son cultivadas para detección de bacterias tienen en efecto una prueba positiva. Claramente, una previa exploración correcta de la orina podría reducir grandemente el número de muestras enviadas al laboratorio para análisis.

La penetración de mercado de las tiras de prueba disponibles actualmente no es grande, en parte porque las pruebas producen resultados positivos falsos, tal como se determina después por análisis de seguimiento en el laboratorio. Por consiguiente, una tira de muestra que provee determinación rápida y certera de la presencia de bacterias reduciría costos y haría posible tratar bacterias en un paciente de inmediato, en lugar de esperar por resultados de laboratorio.

Los presentes inventores estaban investigando métodos por los cuales las bacterias pueden ser detectadas con exactitud. Un acercamiento potencial involucraba encontrar sustancias que podrían enlazarse a bacterias y después ser detectadas y medidas para que la cantidad de bacterias presente pudiera ser determinada. El problema puede ser planteado como sigue: ¿Cómo se enlazan las sustancias a las bacterias y qué sustancias exhiben las propiedades necesarias para que se realicen medidas certeras? El enlace debería ser específico para bacterias. Enlaces no específicos pueden oscurecer los resultados ya que puede variar impredeciblemente y proveer resultados inexactos.

Los anticuerpos son reconocidos por tener la habilidad de unirse a las bacterias y se pensó que si la ALP (fosfatasa alcalina), que puede ser usada para detectar por desarrollo de color los materiales a los cuales se enlaza, podría ser unida a otra sustancia capaz de unirse por sí misma a las bacterias, sería posible medir la cantidad de bacterias presente. Al principio, los experimentos indicaban que la ALP estaba enlazada a bacterias de una forma no específica y por lo tanto se consideraba que presentaba un problema para el desarrollo de un método confiable para medir la cantidad de bacterias presente en una muestra. Posteriores investigaciones fueron dirigidas hacia la eliminación de enlaces no específicos de ALP para que sólo el ALP unido a las sustancias que puedan enlazarse a bacterias sea medidas. Sorprendentemente, se encontró que la creencia que la ALP se enlazaba no específicamente a las bacterias no era correcta y que de hecho, esta sí se enlazaba a bacterias, llevando a la presente invención. Como se verá más abajo, la ALP es una sustancia preferida para medir la cantidad de bacteria, pero pueden usarse otras sustancias, particularmente glicopéptidos y glicoproteínas.

Literatura relacionada y patentes

Se conocen métodos de pruebas rápidas para bacterias, pero difieren del método de la presente invención. En un método, un inmunoensayo para la detección de lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas tal como *E. coli*, *Clamidia* o *Salmonela* usa una proteína de enlace lipopolisacárida o un anticuerpo que tiene afinidad de enlace específica al analito lipopolisacárido como un primero o segundo reactivo de enlace (véase WO 00/60354 y US 5,620,845). En US 5,866,344 se describen otros inmunoensayos para detectar polipéptidos de paredes celulares. Las proteínas pueden ser purificadas en un método usando polipéptidos de enlace polisacárido y sus conjugados (véase US 5,962,289; US 5,340,731; y US 5,928,917). En US 5,856,201 se revela la detección de proteínas usando proteínas de enlace polisacárido y sus conjugados. Los métodos descritos en lo anterior difieren de aquellos de la presente invención, como se verá en la discusión de la presente invención más abajo.

Los métodos que se basan en anticuerpos liposacáridos o proteínas de enlace no proveen una medida de las bacterias totales presentes. Estos tampoco usan un glicopéptido o glicoproteína para enlazarse a la célula bacteriana. Los métodos basados en polipéptidos requieren anticuerpos para enlazarse a la pared celular bacteriana en lugar de usar glicopéptidos o glicoproteínas. Los métodos basados en polipéptidos de enlace polisacárido requieren la fusión de secuencias cortas de polipéptidos en analitos de interés y usan polipéptidos no-glicados para enlazarse a un polisacárido.

Se ha demostrado que las glicoproteínas se enlazan a varias biomoléculas. Por ejemplo, se ha mostrado que las glicoproteínas en la superficie celular de hongos se enlazan a las proteínas del huésped. También, se ha demostrado que glicoproteínas excretadas de células epiteliales se enlazan a lípidos y el enlace de glicoproteínas a carbohidratos

ES 2 344 941 T3

es bien conocido. Todas estas interacciones de glicoproteínas son dependientes de muchos factores, tales como fuerza iónica y pH, y la afinidad de las proteínas individuales para las biomoléculas. Sin embargo, el uso de glicoproteínas en ensayos para la medición de contenido bacteriano no ha sido descrito hasta el momento.

5 Se han aislado receptores de glicoproteínas en monocitos humanos. Se ha mostrado que dos proteínas de enlace extraídas de las paredes celulares de monocitos humanos tienen una afinidad de $9 \times 10^{+6}$ para enlazar fructosilina (lisil péptidos glicosados con glucosa) con 10,000 sitios de enlace activos por célula. Se piensa que estos sitios receptores de proteína pertenecen a la familia de proteínas de enlace ARN y que están involucradas en el proceso de envejecimiento
10 enlazando proteínas relacionadas con la edad tales como albúmina glicosada. Sin embargo, la técnica previa en receptores de glicoproteína no enseña que los receptores sobre las paredes celulares podrían ser usados para la detección de células. No se provee ningún medio para la generación de señal, por partículas de color o reacciones enzimáticas que puedan ser usadas como una medida de la cuenta o detección de células.

15 Las bacterias son conocidas por unirse al tejido del huésped, usualmente por adhesión de la membrana celular bacteriana a proteínas de matriz extracelulares del huésped. Se conoce que este enlace ocurre a través de varias formas de interacción, por glicoaminoglicanos, colágenos, proteínas e integrinas en su superficie. Por lo tanto, la superficie celular, incluyendo superficies bacterianas celulares, puede ser visualizada como un mosaico de moléculas capaz de enlazarse a proteínas de los tejidos del huésped como también a sitios receptores del huésped.

20 La interacción entre células bacterianas y glicoproteínas es generalmente conocida, pero el enlace de glicopéptidos específicos a una célula bacteriana no ha sido revelado. Ha sido descrita la adhesión celular bacteriana a proteínas de matriz extra celulares tales como fibronectina y lamina. Se mostró que este enlace ocurre entre las adhesiones celulares y grupos glicosados sobre las proteínas. Se han mostrado resultados similares con proteínas de tejido conectivo y células bacterianas. Estructuras de polipéptido y carbohidrato de glicoproteínas pueden tener gran variación y las estructuras
25 químicas de glicopéptidos y glicoproteínas son usualmente desconocidas, tales como aquellas que enlazan células bacterianas.

Se han descrito métodos para medir el enlace de glicoproteínas a células bacterianas; sin embargo, la medida de bacterias por enlace de glicopéptido o glicoproteína no ha sido descrita. Más particularmente, el enlace de glicopéptidos o glicoproteínas que son enzimas o están unidas a marcas de detección no ha sido revelado.
30

El enlace de paredes celulares a fosfatasa alcalina (ALP) es conocido, pero en este momento, no es posible asignar una función precisa a ninguna fosfatasa alcalina diferente de la de catálisis de la hidrólisis de fosfomonoésteres. Es conocido que daños al tejido causan una liberación de estas ALP iso-enzimas proporcionando importancia clínica.
35

Ciertas ALP iso-enzimas son conocidas por ser enlazadas a la membrana. Las isoenzimas fosfatasa alcalina de intestino, de hígado, de hueso, de riñón y de placenta son ejemplos de enzimas que son conocidas por tener enlace de membrana a paredes celulares, incluyendo dipeptidilpeptidasa, aminopeptidasas tales como alanina aminopeptidasa, endopeptidasa, gama-glutamyl transferasa, lactasa, alfa-D-glucosidasas, hidrolasas tales como glicosidasa y 5' nucleotidasa. Se sabe que el enlace de membrana celular para ALP ocurre a través de un ancla C-terminal glican-fosfatidilinositol en la cual los triglicéridos de cadena larga del ancla son incorporados en la membrana de lipoproteína. El ancla C-terminal glican-fosfatidilinositol está ausente del ALP producido por la bacterias *E coli* y el ALP de *E coli* es considerado una enzima soluble. Por lo tanto, el enlace de ALP a *E coli* en la presente invención tendría que ocurrir por otro mecanismo.
40
45

Se ha usado ALP en algunas aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo, se ha usado ALP en una prueba diagnóstica de inmunoensayo como una marca para el inmunoensayo; véase US 5,225,328. Sin embargo, no ha sido usada en una prueba de fase seca sin un anticuerpo para la detección de bacterias.

50 Los presentes inventores han descubierto que todas las células bacterianas tienen la habilidad de enlazar ciertas glicoproteínas a través de múltiples sitios de enlace. Como resultado de este descubrimiento, ellos han encontrado que tales glicoproteínas pueden ser usadas en tiras de prueba que tienen la habilidad de detectar todas las bacterias presentes con exactitud, como será visto en la detallada discusión de la invención que sigue.

55 **Resumen de la invención**

La invención es definida por las reivindicaciones 1-12.

60 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 ilustra los resultados del Ejemplo 1.

La Fig. 2 ilustra resultados adicionales del Ejemplo 1.

65 La Fig. 3 ilustra los resultados del Ejemplo 4.

La Fig. 4 ilustra los resultados del Ejemplo 7.

La Fig. 5 ilustra los resultados del Ejemplo 7.

La Fig. 6 ilustra los resultados del Ejemplo 8.

5 La Fig. 7 ilustra los resultados del Ejemplo 8.

La Fig. 8 ilustra el efecto de pH en la actividad de ALP.

La Fig. 9 ilustra el efecto de pH en la actividad de ALP.

10

La Fig. 10 ilustra el efecto de diferentes cationes en el enlace ALP.

La Fig. 11 ilustra el efecto de diferentes cationes en el enlace ALP.

15 Descripción de las modalidades preferidas

Glicoproteínas

20 Las glicoproteínas son compuestas de amino ácidos con enlaces peptídicos y carbohidratos. Las glicoproteínas pueden ser unidas a bacterias a través de atracción de cargas y formar moléculas sobre la pared celular. Como se verá en los ejemplos más abajo, la cantidad de la glicoproteína enlazada a las células bacterianas variará dependiendo de varios factores, incluyendo la estructura molecular, presencia de metales, fuerza iónica, y pH del ambiente.

25 Las glicoproteínas, en las que una o más unidades de carbohidratos han sido unidas covalentemente a la proteína, son enzimas intracelulares (por ejemplo glutamato deshidrogenasa, ALP, lactato deshidrogenasa).

30 Las unidades de monómero de carbohidrato que se unen comúnmente a proteínas incluyen galactosa (Gal), manosa (Man), glucosa (Glu), N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), ácidos siálicos (SA), fucosa y xilosa. Las cadenas de carbohidratos ocurren con una amplia variedad de longitudes y estructuras, pero algunas estructuras típicas encontradas son Man-GlcNAc-, GalNAc(Gal)(SA)-, Man(Man(Man)₂) (Man(Man))-GlcNAc-GlcNAc-, Man((Man-GlcNAc-Gal-SA)₂)-GlcNAc-GlcNAc- y aquellas listadas en la Tabla 2 más abajo.

35 Las cadenas de carbohidratos se unen generalmente a proteínas a través de grupos hidroxilo de residuos de amino ácidos de serina (Ser) o treonina (Thr), cadenas laterales del átomo de amida N de asparagina (Asn) o a través de residuos de hidroxil-lisina (Hyl). Los residuos particulares de Ser y Thr O-glicosilados no parecen presentarse en secuencias únicas de amino ácidos, por lo tanto Ser o Thr pueden ser conectados a cualquier amino ácido, tal como Ser-X, Thr-X, donde X puede ser cualquier amino ácido. La glicosilación de residuos de Hyl ocurre en una secuencia característica -Gly-Y-Hyl-Z-Arg-, donde Y y Z son cualquier amino ácido. Los residuos de Asn N-glicosilados se presentan en la secuencia de -Asn-X-Ser- o -Asn-X-Thr-, donde X puede ser cualquiera de los amino ácidos normales, aparte de Pro.

40 Una glicoproteína particularmente efectiva es la fosfatasa alcalina (ALP). La cantidad de la glicoproteína dependerá de la cantidad de bacterias presente en la muestra; por ejemplo, cuando hay bacterias presentes, una cierta cantidad de glicoproteína va a depender del número de sitios de enlace y la fuerza de la constante de enlace. Con una glicoproteína dada y tipo de célula bacteriana se fijan los sitios de enlace y la cantidad de glicoproteína enlazada es directamente proporcional a la cantidad de bacterias presente.

Componentes Adicionales

50 El método de la invención puede ser aplicado a tiras de prueba secas familiares para aquellos diestros en la técnica, o en métodos de prueba húmeda tales como aquellos descritos en los ejemplos de abajo. Dependiendo de la técnica específica, pueden estar presentes compuestos de amortiguación, sustratos para los compuestos de amplificación de enzima de glicoproteína, y otros aditivos tales como compuestos bloqueadores.

55 Se ha descubierto que agregar metales en estado de transición específicos aumenta el enlace de proteína a las paredes celulares bacterianas. Aunque no se requiere, el uso de metales en estado de transición específicos aumenta la sensibilidad de un ensayo basado en proteína glicada enlazada a bacterias.

60 En una modalidad particularmente preferida de la invención, tales metales son usados para aumentar la respuesta de la fracción de marcado. Varios metales han sido evaluados. De éstos, se ha encontrado que el zinc, el cobre y el hierro tienen un efecto beneficioso, particularmente el zinc, como será visto en los ejemplos más abajo.

65 Sustratos para ALP incluyen los ésteres de fosfato de los siguientes grupos orgánicos, alcoholes primarios y alifáticos, azúcares, alcoholes de azúcar, fenoles, naftoles y nucleósidos. Ejemplos de sustratos que forman color visual incluyen naftol-AS-BI-fosfato, naftol-AS-MX-fosfato, p-nitrofenol fosfato fenilfosfato (PPNP), indoxilfosfato, por ejemplo, bromo-cloro-indolil-fosfato (BCIP), fosfato de fenoltaleína, monofosfato y difosfato de timoltaleína, beta-naftilfosfato, sal de dicitlohexilamonio de PPNP para estabilidad, monofosfato de timoltaleína, difosfato de fenoltaleína, fosfato de carboxifenil, beta-glicerofosfato y beta-glicerofosfato. Ejemplos de sustratos fluorescentes para ALP

ES 2 344 941 T3

incluyen metilfluoresceína alfa-naftil fosfato. La fosfatasa alcalina puede ser medida por un amplio rango de sustratos quimioluminiscentes y bioluminiscentes. Ejemplos de sustratos quimioluminiscentes para ALP incluyen adamantil 1,2-dioetano aril fosfato, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, fosfato de fenacilo, NADP, ácido ascórbico 2-O-fosfato, fosfato de cortisol-21-O, NN' dimetil-9,9' bisacridinio dinitrato, derivados de indolil, por ejemplo 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato sal de disodio (BCIP-2Na), D-luciferina-O-fosfato y adamanil 1,2-dioxetano aril fosfato (AMPPD).

Varios amortiguadores, tanto no-transfosforilantes como aquellos de variados grados de propiedad transfosforiladora han sido usados para determinaciones de ALP (es decir, Carbonato, 2-amino-2-metil-1-propanol y dietanolamina). Amortiguadores comúnmente utilizados para ALP incluyen etilaminoetanol (pKa 9.9), dietanolamina (pKa 8.7), tris-(hiroximetil)aminometano (pKa 7.8), 2-amino-2-metil-1-propanol MAP (pKa 9.3), 2-amino-2-metil-1,3-propandiol (pKa 8.6), carbonato de sodio, bicarbonato de sodio (pKa 9.9), glicil-glicina (pKa 8.2), glicina (pKa 9.6), y barbital (pKa 7.44) con actividad medida a rangos de pH de 7 a 10.

Pueden usarse aditivos adicionales tales como co-factores de enzimas para mejorar las condiciones de reacción para enzimas. Pueden usarse manitol y otros alcoholes para aumentar los índices de sustrato de ALP. En el caso de ALP, por lo menos un equivalente de metal de Zn, Ca y Mg para cada molécula de ALP estará presente para proveer actividad catalítica y posiblemente también para mantenimiento de la estructura nativa de la enzima. Los inhibidores de enzima incluyen cisteína, EDTA y ácido tioglicólico, L-fenilalanina, L-homoarginina, L-triptofano, L-leucina, levamisol e imidazol. También es conocido que sales tales como cloruro de sodio pueden usarse para controlar enzimas. También es conocido que surfactantes tales como sulfato dodecil de sodio y ácidos biliares modulan rangos de ensayos de enzimas y sensibilidad.

También pueden usarse sistemas de amplificación de enzimas para aumentar los límites de detección para ensayos de enzimas. Se conocen varios métodos de amplificación de enzimas para la detección de fosfatasa alcalina. Estos incluyen la formación de formazan (INT-violeta colorimétricamente o resazurina fluorimétricamente) a través de sistemas de enzimas (por ejemplo, diaforasa y alcohol deshidrogenasa) que utilizan co-factor de NAD y dependen de ALP para desfosforilar la enzima NADP para producir NAD. Por ejemplo, se ha usado la conversión de fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADP) a NAD⁺ por ALP para amplificación. El compuesto NAD⁺ fue entonces reducido a NADH por alcohol deshidrogenasa en la presencia de etanol incluido en el medio de reacción. A su vez, se convirtió NADH en la presencia de diforasa de nuevo en NAD con reducción simultánea de sal de tetrazolio también presente en el medio. Esto resultó en una acumulación de tinción de color de formazan soluble, proporcional a la concentración de NAD⁺ generada por AP. El NAD⁺ recién formado es reciclado varias veces, resultando en un aumento de 100 veces en sensibilidad.

Compuestos de bloqueo seleccionados del grupo que consiste de polímeros, proteínas no-glicadas, polipéptidos no-glicados, y polisacáridos pueden ser incluidos para reducir interferencia o mejorar color. La interferencia es mejorada previniendo el enlace no específico por sustancias de interferencia a bacterias y en su lugar enlazar sustancias de interferencia al compuesto de bloqueo. El color es mejorado actuando como una capa en extensión que permite que el color sea uniforme en reactivos secos.

Métodos de Prueba

El uso de glicoproteínas para la detección de bacterias puede ser aplicado a una variedad de métodos de prueba. Los métodos requieren combinar una glicoproteína con la muestra que va a ser ensayada, separando la glicoproteína enlazada a bacterias de glicoproteína libre no enlazada y midiendo glicoproteínas enlazadas o libres. Tales pasos pueden ser logrados a través de una variedad de analizadores de manejo de fluidos tales como centrifugación, aparatos microfluídicos, tiras de cromatografía, lectores de filtración y microplacas, para nombrar algunos.

La efectividad de las glicoproteínas para la detección de bacterias es medida de la misma forma para todos los métodos de prueba. La efectividad se mide obteniendo una señal de detección de bacterias que es tres desviaciones estándar de la señal obtenida en la ausencia de bacteria.

Para que las glicoproteínas sean efectivas detectando 1000 bacterias por célula/mL, la constante de asociación debe ser por lo menos 10^{+6} y el número de sitios de enlace de por lo menos 100. Estas medidas de la fuerza de enlace para glicoproteína a bacterias y del número de sitios de enlace para glicoproteína a bacterias permiten una señal suficiente de detección de bacterias. El límite de detección de 1000 bacterias célula/mL es el umbral mínimo clínicamente deseado. Una lectura de fondo suficiente para el enlace de glicoproteína a otros componentes del espécimen, por ejemplo, otras proteínas, debe ser una constante de asociación de menos de 10^{+4} . Usando ALP como un ejemplo representativo, una constante de enlace de $5 \times 10^{+6}$ y el número de sitios de enlace fue estimado en 590.

Ejemplo 1

Ensayo de bacterias enlazando la Fosfatasa Alcalina Intestinal

Células bacterianas (10^6 a 10^8 células/mL) fueron lavadas dos veces con agua después de centrifugación para separar las células en un gránulo empacado de líquido sobrenadante. Las células lavadas en forma de gránulo fueron

ES 2 344 941 T3

suspendidas en 40 μL de agua y se agregaron 10 μL de fosfatasa alcalina intestinal bovina (ALP) acuosa (2 μg o 10,000 unidades). La mezcla fue dejada a temperatura ambiente por 30 minutos y después centrifugada, después de lo cual los gránulos bacterianos fueron lavados con agua 4-5 veces (50 μL). Todos los sobrenadantes de lavado fueron combinados. Una muestra en blanco sin células fue diluida de la misma forma. Los gránulos finales fueron suspendidos en 50 μL de agua y ambos sobrenadantes y suspensiones celulares fueron ensayadas para detección de enlace de ALP usando 2.5 μL de 0.005 M de fosfato para-nitrofenol (PNPP) en Tris o amortiguador EPPS a pH 7.5. La hidrólisis del sustrato resulta en color amarillo (PNPP) o azul-verde (BCIP) que es directamente proporcional a la cantidad de ALP enlazado a la bacteria. La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) fue probada usando sustratos comunes tales como BCIP (bromo-cloro-indolil-fosfato) formando un color azul/verde en amortiguador Tris, pH 7.5. Después de 10 minutos a temperatura ambiente las muestras fueron leídas en un lector de placa (Biotek Powerwave Absorbance Reader) a una longitud de onda de 405 nm. Un juego paralelo de bacterias fue corrido sin agregar ALP como control.

Se observó el enlace de ALP intestinal a células bacterianas. En la Figura 1, las barras a rayas muestran que células suspendidas después del tratamiento con ALP y lavados tenían más actividad ALP intestinal que las células no tratadas (barras sólidas). Las barras sólidas muestran que las células suspendidas no tratadas con ALP intestinal tenían alguna actividad ALP, considerándose como ALP nativo en las bacterias. Como control, la actividad ALP de las soluciones de tratamiento muestra la actividad máxima esperada sin contribución de la ALP nativa.

La Figura 1 demuestra enlace ALP intestinal a todas las cepas bacterianas muestreadas. Se encontró que tanto las bacterias gram positivas como las cepas #3 y #6 de *Staphylococcus aureus* (*Sf*) como para las bacterias gram negativas tales como las cepas #9 y #14 de *Escherichia coli* (*E. coli*) se enlazan al ALP. Nuevamente las barras a rayas que son significativamente más grandes que las barras sólidas demuestran esto. La Figura 2 muestra que la cantidad de ALP enlazado o la actividad generada es directamente proporcional a la cantidad de células bacterianas presentes. La actividad de ALP de las células suspendidas aumentó con cantidades aumentadas de células.

El mecanismo del enlace de ALP a las células bacterianas no es completamente entendido, pero se cree que péptidos glicosados en ALP u otras glicoproteínas se están enlazando a los receptores de proteínas anclados en la pared celular o están enlazando la membrana peptidoglicon. Se conoce que tanto las bacterias gram positivas como las gram negativas tienen receptores de proteína en sus membranas mas externas. Para bacterias gram negativas, la membrana externa lipopolisacárida tiene receptores de proteínas. Para las bacterias gram positivas la membrana externa peptidoglicon tiene receptores de proteínas.

Ejemplo Comparativo 2

Ensayo de bacterias por enlace de proteína no-glicosada a bacteria

Como control, una proteína enzimática sin glicosación, beta-galactosidasa, fue probada para enlazarse a paredes celulares bacterianas. Las bacterias de *Staph.* y *E. coli* fueron muestreadas en cuanto al enlace de beta-galactosidasa. Las beta-Galactosidasas (20 mU) fueron agregadas a suspensiones salinas de 10^8 células/mL de ambas bacterias y fueron ensayadas al igual que los gránulos (células re-suspendidas en agua) y sobrenadantes después de centrifugar las bacterias usando dimetilacridinio B-D-galactosa (DMAG) como sustrato. El ensayo para determinar la cantidad de enzima fue agregar 10 μL de DMAG acuosa (0.5 mM) y 5 μL de amortiguador tris acuoso (1M) ajustado para un pH 7.5 o bacterias de prueba (10^7 células) y H_2O a 100 μL . El color amarillo brillante de DMAG cambia a verde claro a azul oscuro en 5-30 minutos (con beta-galactosidasa en 5 min) lo cual se lee a 634 nm en un lector de placa.

La beta-D-galactosidasa es una proteína no-glicoproteína y no-membrana. En estos experimentos, la beta-D-galactosidasa no se enlazó a bacterias y no fue posible la medición de bacterias.

Ejemplo 3

Ensayo de bacterias por enlace de proteínas glicosadas a bacterias

Células bacterianas (1 a 4.5×10^7 células/mL) fueron lavadas dos veces con agua después de centrifugación para separar las células en un gránulo empacado de líquido sobrenadante. Las células lavadas en forma de gránulo fueron suspendidas en 20 μL de N-2-hidroxiethyl piperazina-N'-[3-propano ácido sulfónico] se agregaron amortiguador EPPS (50 mM a pH 8.0) y 30 μL de agua. Proteína(s) glicosadas (2-40 μg). En algunos casos una proteína glicosada (2-40 μg) y fosfatasa alcalina intestinal bovina (ALP) (2 μg o 10,000 unidades) fueron agregadas y el enlace de las proteínas glicosadas fue medido por la reducción del enlace de ALP.

La mezcla de proteínas glicosadas y células bacterianas fue dejada a 25°C por 15 minutos. La mezcla fue entonces centrifugada a 30,000 rpm por 30 minutos después de lo cual las células bacterianas formaron un gránulo en el fondo del tubo y fueron lavadas con agua 4-5 veces (50 μL). La centrifugación permite la separación de glicoproteína enlazada a las células bacterianas de proteína(s) glicosadas no enlazadas.

ES 2 344 941 T3

Después del lavado, los gránulos bacterianos fueron suspendidos en 50 μ L de amortiguador de borato (25 mM a pH 9.0). Una alícuota de 5 μ L de la suspensión fue ensayada en cuanto a la detección de enlace ALP agregando 5 μ L de fosfato para-nitrofenol (PNPP, 100 mM), 50 μ L de amortiguador de borato de sodio (25 mM a pH 9.0) y 140 μ L de agua. La hidrólisis del sustrato PNPP resultó en un color amarillo. El color se lee a 405 nm usando un lector de placa ELISA durante 15-30 minutos. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de ALP enlazada a las adhesiones de célula bacteriana para grupos glicosilados.

Por comparación, varias proteínas glicosiladas y no-glicosiladas fueron probadas para enlazarse a bacterias (véase Tabla 1). La albúmina, prealbúmina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-microglobulina, proteína de enlace de retinol, glicoproteína alfa-1-ácido, alfa-2-glicoproteína, transferrina, glicoproteína Tamm-Horsfall e inmunoglobulinas eran todas proteínas glicosiladas conocidas tal como fueron recibidas de los proveedores. La hemoglobina, lisozima, y mioglobina son todas proteínas no-glicosiladas como fueron recibidas de los proveedores. Se encontró que todas las proteínas se enlazaron a las células bacterianas por medio de proteína enlazada usando azul de comassie brillante.

Solamente una proteína que se enlaza a las adhesiones celulares para grupos glicosilados causa la inhibición del enlace de ALP por las bacterias. Una proteína que se enlaza a las adhesiones celulares para grupos glicosilados provee un número positivo en la Tabla 1. Por ejemplo, la albúmina previno 50% de ALP de enlazarse a la bacterias *E. coli*. Como se ve en la Tabla 1 todas las proteínas glicosiladas inhibieron el enlace de ALP por las bacterias. Proteínas no-glicosiladas tales como hemoglobina, mioglobina y lisozima no inhibieron el enlace de ALP. Como un control, se probaron tres polipéptidos no glicosilados (poliarginina, polilisina, polihistidina) y no se encontró que inhibieran la actividad de ALP.

TABLA 1

Demostración del enlace de proteínas glicosiladas a bacteria

Proteína agregada	<i>E.coli</i>	<i>S.faec.</i>
Albúmina	50%	61%
Prealbúmina	50%	57%
Glicoproteína Tamm-Horsfall	40%	49%
Alfa-1-Antitripsina	84%	74%
Mioglobina (no-glicosilada)	NI	NI
Hemoglobina (no-glicosilada)	NI	NI
Transferrina	75%	75%
Proteína de Enlace Retinol	81%	83%
Glicoproteína alfa-1-ácido	86%	90%
Beta-2-Glicoproteína	74%	61%
Lisozima (no-glicosilada)	NI	NI
IgG, IgA, IgM y Fragmentos	63%	71%
Polilisina, poli arginina poli histidina	NI	NI

*NI = no inhibición

ALP es un ejemplo de una proteína glicosilada que tiene funcionalidad enzimática y genera una señal, como se demuestra en el Ejemplo 1. Otros ejemplos de proteínas enzimáticas glicosiladas incluyen fosfatasa ácida, fucosidasa, fosfolipasa, glucocerebrosidasa, hidrolasa, arilsulfatasa A, amilasas, celobiohidrolasa y peroxidasa.

Pueden usarse aditivos de bloqueo para bloquear reacciones en competencia y reducir interferencia o actuar como agentes de distribución. Ejemplos son las glicoproteínas no enlazadoras del Ejemplo 3. Otros son polímeros tales como poli (vinil pirrolidona) o polivinil alcohol y proteínas tales como caseína, gelatina, albúmina, celulosa hidrófoba, y polisacáridos.

ES 2 344 941 T3

Ejemplo 4

Ensayo de bacterias por enlace de iso-formas ALP a bacteria

5 Células bacterianas (1 a 4.5×10^7 células/mL) fueron lavadas dos veces con agua después de centrifugación para separar células en un gránulo empacado del líquido sobrenadante. Las células lavadas en forma de gránulo fueron suspendidas en $20 \mu\text{L}$ de amortiguador EPPS (50 mM a $\text{pH } 8.0$) y $30 \mu\text{L}$ de agua. Se agregó hemoglobina ($20 \mu\text{g}$) como aditivo bloqueador. Se agregó fosfatasa alcalina (ALP) (100 mUnidades) de fuentes de intestino, placenta, y bacterias.

10 La mezcla de proteína glicada y células bacterianas fue dejada a 25°C por 15 minutos. La mezcla fue entonces centrifugada a $30,000 \text{ rpm}$ por 30 minutos después de lo cual las células bacterianas formaron un gránulo en el fondo del tubo y fueron lavadas con agua $4-5$ veces ($50 \mu\text{L}$). La centrifugación permite la separación de glicoproteína enlazada a las células bacterianas de proteína(s) glicadas no enlazadas.

15 Después del lavado, los gránulos bacterianos fueron suspendidos en $50 \mu\text{L}$ de amortiguador tetraborato de sodio (25 mM a $\text{pH } 9.5$). Una alícuota de $5 \mu\text{L}$ de la suspensión fue ensayada para detección de enlace de ALP agregando $5 \mu\text{L}$ de fosfato de para-nitrofenol (PNPP, 100 mM), $50 \mu\text{L}$ de amortiguador de borato de sodio (25 mM a $\text{pH } 9.0$) y $140 \mu\text{L}$ de agua. La hidrólisis del sustrato de PNPP resultó en un color amarillo. El color se lee a 405 nm usando un lector de placa ELISA entre $15-30 \text{ min}$ y la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de ALP enlazado a las adhesiones de células bacterianas para los grupos glicados. Los resultados son ilustrados en la Figura 3.

25 Una comparación de isoenzimas ALP de fuentes de placenta, bacterianas y de intestino permite un entendimiento de qué glicosilación es necesaria para el enlace. Las formas ISO de ALP intestinal, de hígado, de hueso, y de placenta tienen diferencias en estructuras de carbohidrato y cantidad de ácido siálico. La ALP intestinal carece de ácidos siálicos terminales en sus cadenas de carbohidrato mientras la de placenta y bacterias tienen residuos de ácido siálico. El ALP bacteriano carece de porciones de glicofosfolípido con enlace de membrana presente en el ALP mamífero. La ALP de placenta contiene fucosa, manosa y galactosa mientras la ALP intestinal tiene un alto contenido de hexosa y hexoamina.

30 De acuerdo con la Figura 3, los glicofosfolípidos no son requisito para el enlace de glicoproteína a bacterias como la ALP bacteriana que enlaza bacterias pero carece de glicofosfolípidos. Todo el ALP se enlazó a bacterias hasta cierto punto aunque la ALP placentaria exhibió la actividad enzimática más baja como también el enlace a bacterias más bajo. Este resultado apoyó nuestra creencia de que ciertos grados de glicosilación son mejores enlazadores para bacterias.

35 También se encontró que el ALP intestinal polilisina-conjugada enlaza las bacterias. No se encontró que la conjugación de ALP con un péptido no glicado inhibiera el enlace a bacterias y podría proveer puentes de enlace para marcadores.

Ejemplo 5

Ensayo de bacterias en presencia de carbohidratos, polisacáridos, glicopéptidos y lectinas

45 Células bacterianas (1 a 4.5×10^7 células/mL) fueron lavadas dos veces con agua después de centrifugar para separar las células en un gránulo empacado del líquido sobrenadante. Las células lavadas en forma de gránulo fueron suspendidas en $20 \mu\text{L}$ de amortiguador EPPS (50 mM a $\text{pH } 8.0$) y $30 \mu\text{L}$ de agua. Se agregó hemoglobina ($20 \mu\text{g}$) como un aditivo bloqueador. Se agregaron osfatasa alcalina (ALP) (100 mUnidades) de intestino bovino y $15 \mu\text{g}$ de carbohidratos simples o proteoglicanos o lectinas.

55 La mezcla de proteína glicada y células bacterianas fue dejada a 25°C por 15 minutos. La mezcla fue entonces centrifugada a $30,000 \text{ rpm}$ por 30 minutos después de lo cual las células bacterianas formaron un gránulo en el fondo del tubo y fueron lavadas con agua $4-5$ veces ($50 \mu\text{L}$). La centrifugación permite la separación de glicoproteína enlazada a las células bacterianas de proteína(s) glicada no enlazada.

60 Después del lavado, los gránulos bacterianos fueron suspendidos en $50 \mu\text{L}$ de amortiguador de tetraborato de sodio (25 mM a $\text{pH } 9.5$). Una alícuota de $5 \mu\text{L}$ de la suspensión fue ensayada para la detección de enlaces ALP agregando $5 \mu\text{L}$ de fosfato para-nitrofenol (PNPP, 100 mM), $50 \mu\text{L}$ de amortiguador borato de sodio (25 mM a $\text{pH } 9.0$) y $140 \mu\text{L}$ de agua. La hidrólisis del sustrato PNPP resultó en un color amarillo. El color se lee a 405 nm usando un lector de placas de ELISA durante $15-30$ minutos y la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de ALP enlazada a las adhesiones de la célula bacteriana para grupos glicados.

65 El enlace de ALP a bacterias fue demostrado por una absorbancia de 1.8 a 2.0 en la Tabla 2 en la ausencia de carbohidratos, proteoglicanos, y lectinas. Los monosacáridos (carbohidratos simples) incluyendo Glucosa, Manosa, Galactosa y Ácido Siálico no produjeron ningún efecto sobre el enlace a bacterias de ALP (todas las fuentes). Por lo tanto los carbohidratos simples no están involucrados en el enlace y no son apropiados como enlazadores bacterianos

ES 2 344 941 T3

para atarse a las marcas de detección. Esto también respalda la necesidad de glicopéptidos o glicoproteínas como enlazadores en lugar de simples glico-unidades.

5 Los polisacáridos inhibieron débilmente el enlace a bacterias de ALP a un grado dependiente de la unidad de
carbohidrato repetida. Estos resultados muestran que los polisacáridos están involucrados en el enlace a bacterias
con ALP. Los polisacáridos con N-acetilgalactosamina fueron más inhibidores y seguramente contenían unidades
residuales de péptido. Por contraste el lipopolisacárido (LPS) estuvo sin ningún efecto para las fuentes probadas (B4
y B8 de 2 serotipos diferentes de *E. coli*). El lipopolisacárido contiene Lípido Ay O-antígeno en su estructura externa
y no expone su núcleo polisacárido.

10 El ácido lipoteicoico es un ejemplo de polisacáridos con carbohidrato repetido y unidades (Hyl) de amino ácido.
La estructura del polisacárido varía con la fuente de LTA. Se conocen estructuras con y sin N-acetilgalactosamina.
En nuestros resultados LTA (*S. sanguis*) inhibe fuertemente la actividad ALP de enlace a bacteria, mientras que,
dependiendo de la fuente, se observó variada inhibición o falta de inhibición. Se encontró que el ácido teicoico en
15 sí mismo con carbohidrato repetido y unidades (Hyl) de amino ácido es igualmente inhibitorio. Esto apoya nuestra
creencia que el enlace de glicopéptidos a bacterias involucra componentes de carbohidrato y aminoácidos.

Las lectinas son proteínas encontradas en semillas de plantas que enlazan polisacáridos y monosacáridos atados
a péptidos. Como se ve en la Tabla 2 las lectinas inhibieron el enlace de bacterias a ALP dependiendo de la unidad
20 polisacárida que la lectina enlazó. Estos resultados también respaldan la involucración de glicopéptidos en el enlace
de bacterias y el ALP. La lectina enlaza el grupo glico de ALP y previene que ésta reaccione con bacteria. Ya que
varias de las lectinas son activas pero solo enlazan un tipo de grupo glico, varios tipos de grupos glico péptidos pueden
causar el enlace de ALP a bacteria.

TABLA 2

<u>Carbohidratos adicionales, proteoglicano, y lectinas</u>	<u>E. coli</u>	<u>S. faec.</u>
Ninguno	1.8	2.0
Carbohidrato simple		
<hr/>		
Glucosa (β -D-Glucosa)	1.8	2.4
Galactosa (Gal o β -D-Galactosa)	2.0	2.0
Fucosa	2.0	2.3
Carbohidrato simple		
<hr/>		
Manosa (Man)	1.7	2.4
Ácido Siálico (Ácido N-Acetilglucosamínico)	2.0	1.7
Ácido Murámico	1.8	2.1
GlcNAc (N-Acetil- β -D-Glucosamina)	2.0	2.0
GalNAc (N-Acetil- β -D-Galactosamina)	1.8	1.9
Ácido Glucurónico	1.9	2.0
Ácido Idurónico	1.9	2.0
Polisacárido		
<hr/>		
Sulfato A Condroitina (repetiendo GalNAc & glucurónico)	1.1	1.3

ES 2 344 941 T3

	Sulfato B Condroitina	0.9	0.5
	(repitiendo GalNAc & Acido iduronico)		
5	Ácido Hialurónico	1.8	2.0
	(repitiendo GlcNAc & ácido glucurónico)		
	Lipopolisacárido	1.8	2.0

10 Glicopéptido

	Ácido Lipoteicoico	0.2	0.2
15	(de S. sanguis)		

20 Lectinas que enlazan glicopéptidos

	Euonymus europeus (Gal-Gal)	1.6	1.8
	Bauhinia purpurea (Gal-GalNAc)	0.3	0.4
	Maackia Amurensis (Ácido Siálico)	0.1	0.1
25	Concanavalina A (Man, Glc)	0.0	0.1
	Caragana arborescens (GalNAc)	0.8	1.0

30 Los datos en el Ejemplo 5 muestran que la porción glicada pueden ser polisacáridos o un monosacárido atado a por lo menos un péptido. Ejemplos de polisacáridos o monosacáridos incluyen aquellos en la Tabla 2.

35 Ejemplo 6

Método de separación alternativo de proteínas glicadas enlazadas a bacteria

40 Bacterias enlazada a fosfatasa alcalina (ALP) puede ser separada usando una membrana (Nylon 66 Loprodina de bajo enlace de proteína) en placas respaldadas de microtítulo (Nunc Nalge International).

45 Las placas de Ioprodina-membrana-respaldadas fueron tratadas con detergente al 1 o 2% (Tween 20 o TritonX305) en agua o amortiguadores (TBS: Tris, 25 mM, pH 7.6 conteniendo 150 mM NaCl o KCO₃: 0.1M, pH 9.6) toda la noche a temperatura ambiente.

50 Soluciones bloqueadoras fueron filtradas al vacío. Suspensiones de bacterias (10^7 células, 100 μ l) en salina fueron combinados con 50 μ l de amortiguador EPPS (0.05M, pH 8.1) y 50 μ l de H₂O que contienen 20 mU de ALP. La solución combinada fue incubada por 15 minutos a 37°C en un agitador y después agregada a la placa de Ioprodina-membrana- respaldada.

55 La solución fue filtrada al vacío dejando bacterias adherida sobre la membrana y después lavada dos veces con 2% Tween20 en agua. A la membrana lavada, 200 μ l de H₂O con 50 μ l de Glicina (0.05M, pH 10.4) y conteniendo 1 mM se agregó PNPP y el color se formó debido a la bacterias enlazada a ALP leída a 405 nm.

TABLA 3

	Condición	Enlace de Bacterias a ALP (O.D. a 405 nm)		
	Concentración ALP	1.0 mU	2.0 mU	5.0 mU
65	Sin bacteria	0.04	0.05	0.16
	Con bacteria	0.13	0.30	0.83

ES 2 344 941 T3

La separación de *E. coli* con ALP enlazada de ALP sin enlazar es mostrada por una exclusión de tamaño en la membrana en el Ejemplo 6 y por centrifugación en los Ejemplos 1-5. El tamaño de *E. coli* es $1 \times 1 \times 2 \mu\text{m}$ y cualquier membrana, filtro o aparato atrapando partículas de este tamaño sería aceptable. Éstos incluyen aparatos microfluídicos, filtros, cromatografía de columna y cromatografía de tiras. La masa de *E. coli* es 1.6×10^{-12} gm/célula y cualquier membrana, filtro o aparato atrapando una masa de este tamaño sería también aceptable.

Ejemplo 7

10 *Efecto de Cationes Divalentes en Proteína enlazada a Bacteria*

Células bacterianas (1 a 4.5×10^7 células/mL) fueron lavadas dos veces con agua después de centrifugación para separar células en un gránulo empacado del sobrenadante líquido. Las células lavadas en forma de gránulo fueron suspendidas en $20 \mu\text{L}$ de amortiguador EPPS (50 mM a $\text{pH } 8.0$) y $30 \mu\text{L}$ de agua. Fosfatasa alcalina (ALP) intestinal bovina ($2 \mu\text{g}$ o $10,000$ Unidades) fue agregada y 0.2 mM de varios cationes.

La mezcla de proteína glicada y células bacterianas fue dejada a 25°C por 15 minutos. La mezcla fue entonces centrifugada a $30,000 \text{ rpm}$ por 30 minutos después de lo cual las células bacterianas formaron un gránulo en el fondo del tubo y fueron lavadas con agua $4-5$ veces ($50 \mu\text{L}$). La centrifugación permite la separación de glicoproteína enlazada a las células bacterianas de proteína(s) glicada no enlazada.

Después de lavar, los gránulos bacterianos fueron suspendidos en $50 \mu\text{L}$ de amortiguador borato (25 mM a $\text{pH } 9.0$). Una alícuota de $5 \mu\text{L}$ de la suspensión fue ensayada para la detección de enlace ALP agregando $5 \mu\text{L}$ de fosfato para-nitrofenol (PNPP, 100 mM), $50 \mu\text{L}$ de amortiguador borato de sodio (25 mM a $\text{pH } 9.0$) y $140 \mu\text{L}$ de agua. La hidrólisis del sustrato PNPP resultó en un color amarillo. El color fue leído a 405 nm usando un lector de placa ELISA entre $15-30$ minutos; la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de ALP enlazada a la célula bacteriana.

TABLA 4

Condición	O.D a 405 nm	
	Sin ALP	Con ALP
Sin catión	0.18	0.30
+CaCl ₂ (1 mM)	0.23	0.36
+MgCl ₂ (1 mM)	0.20	0.44
+ZnCl₂ (0.2 mM)	0.23	0.53

Como es visto en la Tabla 4, Zn^{2+} (0.2 mM) resultó en enlace significativamente más alto de ALP a la bacteria. Se ha realizado un estudio enlace dependiente de concentración en la presencia de concentración aumentada de zinc con cepa de *S. faecalis* como se muestra en la Figura 4. El resultado indicó que enlazado óptimo ocurre a concentración de 1 mM zinc. Los estudios han sido continuados con diferentes cepas de bacterias en la presencia de 1 mM de Zn^{2+} y el enlace de ALP podría ser monitoreado inclusive a una concentración de 5×10^6 bacterias (Fig. 5).

Ejemplo 8

55 *Efecto de Varios Cationes en enlace de ALP a Bacteria*

Células bacterianas (1 a 4.5×10^7 células/mL) fueron lavadas dos veces con agua después de centrifugación para separar células en un gránulo empacado del sobrenadante líquido. Las células lavadas en forma de gránulo fueron suspendidas en $20 \mu\text{L}$ de amortiguador EPPS (50 mM a $\text{pH } 8.0$) y $30 \mu\text{L}$ de agua. Fosfatasa alcalina (ALP) intestinal bovina ($2 \mu\text{g}$ o $10,000$ Unidades) fue agregada y 0.2 mM de cada catión.

La mezcla de proteína glicada y células bacterianas fue dejada a 25°C por 15 minutos. La mezcla fue entonces centrifugada a $30,000 \text{ rpm}$ por 30 minutos después de lo cual las células bacterianas formaron un gránulo en el fondo del tubo y fueron lavadas con agua $4-5$ veces ($50 \mu\text{L}$). La centrifugación permite la separación de glicoproteína enlazada a las células bacterianas de proteína(s) glicada no enlazada.

Después de lavar, los gránulos bacterianos fueron suspendidos en $50 \mu\text{L}$ de amortiguador borato (25 mM a $\text{pH } 9.0$). Una alícuota de $5 \mu\text{L}$ de la suspensión fue ensayada para la detección de enlace ALP agregando $5 \mu\text{L}$ de fosfato para-nitrofenol (PNPP, 100 mM), $50 \mu\text{L}$ de amortiguador borato de sodio (25 mM a $\text{pH } 9.0$) y $140 \mu\text{L}$ de agua. La hidrólisis

ES 2 344 941 T3

del sustrato PNPP resultó en un color amarillo. El color fue leído a 405 nm usando un lector de placa ELISA entre 15-30 minutos; la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de ALP enlazada a la célula bacteriana.

5 Se había observado dependencia de zinc de toda la proteína enlazada a la pared celular bacteriana como se mencionó anteriormente. El efecto de varios cationes (2 mM) en el enlace de ALP de mucosa intestinal bovina (Biozyme) a diferentes bacterias es mostrado en la Figura 6. Adicionalmente al zinc, Cu^{2+} , Fe^{2+} y Fe^{3+} también parecen estimular el enlace ALP- en cepas Gram-positivas y Gram-negativas de bacterias (Sf- Estaf. faec.; Ec: *E. coli*). La Figura 6 también indica inhibición total de actividad ALP en la presencia de EDTA (10 mM). Se ha seguido usando para estudios
10 continuados de enlace ALP. El enlace de la fosfatasa alcalina a bacterias parece ser muy dependiente de la presencia de cationes como es visto en la Figura 6. Los datos en la Figura 7 muestran el enlace de varias proteínas glicadas en ausencia y presencia de zinc lo que demuestra claramente la dependencia de catión de todas las proteínas probadas para enlace a la pared celular bacteriana Gram-positiva y Gram-negativa. La cantidad de ALP usada para este estudio fue tan pequeña que solo puede ser detectada midiendo actividad enzimática.

15 Ejemplo 9

Condiciones Óptimas para Concentración de Zn en Enlace ALP

20 La actividad de la ALP humana placentaria es comparable a ALP de otras fuentes cuando ensayadas en amortiguador de glicina como es visto en las Figuras 8-9. Entre tres cationes efectivos para el enlace de ALP a la bacteria, el zinc fue el mejor metal cuando las bacterias enlazadas a ALP (ambas Staph y *E. coli*) fueron ensayadas en amortiguador glicina, pH 10.0 (Figs. 10-11). El enlace fue realizado a pH 8.0 en amortiguador EPPS.

25 En las Figuras 8-11, se usaron las siguientes abreviaturas:

B1BZ = intestinal bovina del primer vendedor

30 B1Si = intestinal bovina del segundo vendedor

HPL = placenta humana

Bact = bacterial

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 344 941 T3

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir el contenido bacteriano de fluidos que comprende:

- 5
- a. enlazar una cantidad efectiva de una glicoproteína con bacterias contenida en una muestra de fluido, dicha glicoproteína teniendo una funcionalidad enzimática generando una señal para indicar su presencia;
 - b. separar glicoproteína en exceso no enlazada de dicha muestra fluida después de reaccionar dicha glicoproteína con bacterias en dicha muestra en el paso (a);
 - 10 c. medir la cantidad de dicho marcador que permanece después de separar dicha glicoproteína en exceso no enlazada de (b); y
 - d. determinar el contenido bacteriano de dicha muestra como relacionada a la cantidad de dicho marcador medido en el paso (c);
 - 15

donde dicha glicoproteína es por lo menos un miembro del grupo que consiste de enzimas intracelulares y dichas enzimas inherentemente proveen una fracción de marcador que sirve como dicho marcador directamente enlazando dichas bacterias.

20

2. Un método de la Reivindicación 1 donde dicha glicoproteína tiene un enlace constante a bacterias de por lo menos 10^6 y por lo menos 100 sitios de enlace.

3. Un método para la Reivindicación 1 donde dichas enzimas intracelulares son seleccionadas del grupo que consiste de glutamato hidrogenasa, ALP, y lactato deshidrogenasa.

25

4. Un método para la Reivindicación 1 donde dicha glicoproteína es una enzima intracelular seleccionada del grupo que consiste de fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, fucosidasa, manosidasa, hexaminidasa, alfa-galactosidasa, fosfolipasa, hialuronidasa, glucocerebrosidasa, hidrolasa, arilsulfatasa A, amilasas, celobiohidrolasa, y peroxidasa.

30

5. Un método de la Reivindicación 3 donde dicha enzima es fosfatasa alcalina (ALP).

6. Un método de la Reivindicación 5 donde dicha ALP es ALP intestinal.

35 7. Un método de la Reivindicación 5 donde ALP es medida agregando como reactivo PNPP.

8. Un método de la Reivindicación 7 donde el color desarrollado por dicho reactivo es leído a una longitud de onda de 405 nm.

40 9. Un método de la Reivindicación 1 que comprende adicionalmente agregar a dicha muestra compuestos de bloqueo seleccionados del grupo que consiste de polímeros, proteínas no glicadas, polipéptidos no glicados, y polisacáridos.

45 10. Un método de la Reivindicación 1 que comprende adicionalmente agregar por lo menos un catión capaz de aumentar el enlace de dicha glicoproteína a bacteria.

11. Un método de la Reivindicación 10 donde dicho catión es por lo menos un miembro del grupo que consiste de zinc, cobre y hierro.

50 12. Un método de la Reivindicación 11 donde dicho catión es zinc.

55

60

65

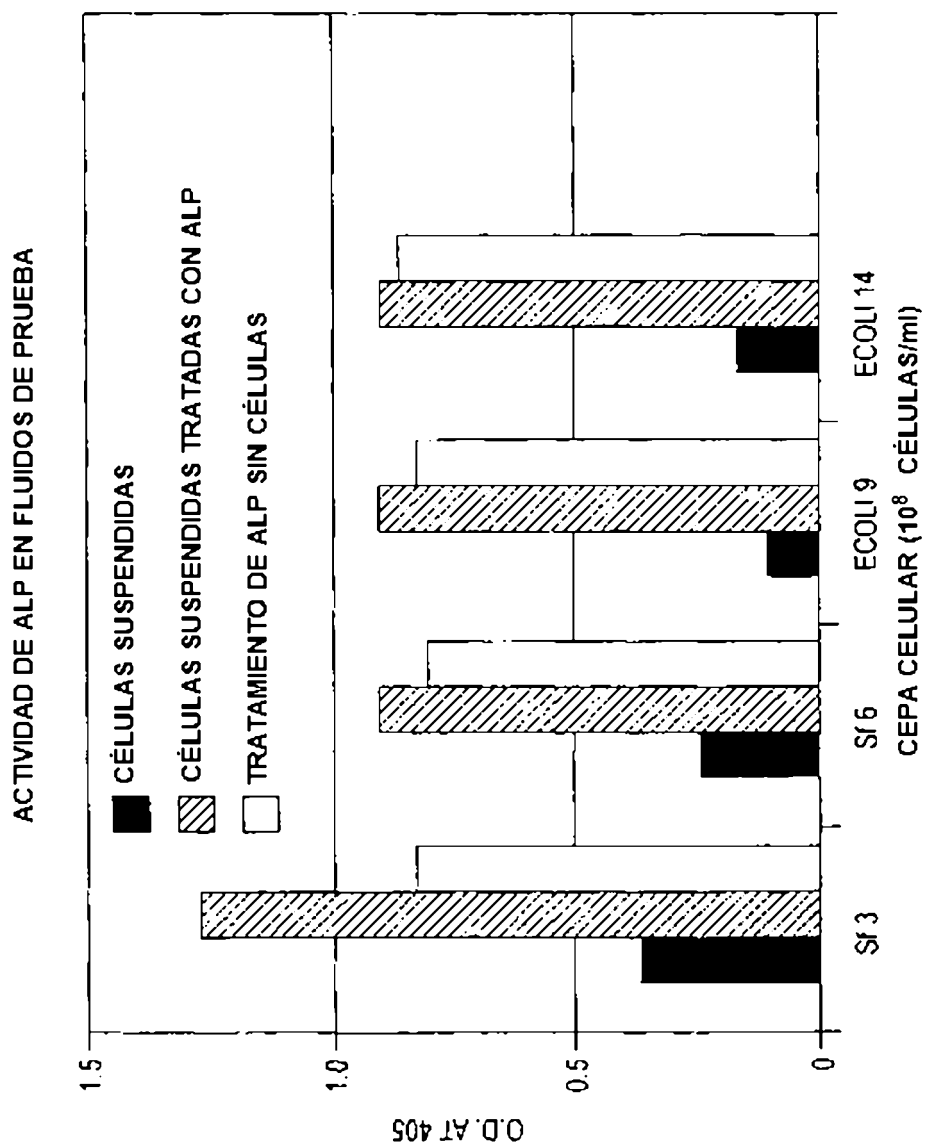


FIG. 1

ENLACE DE ALP A BACTERIAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES

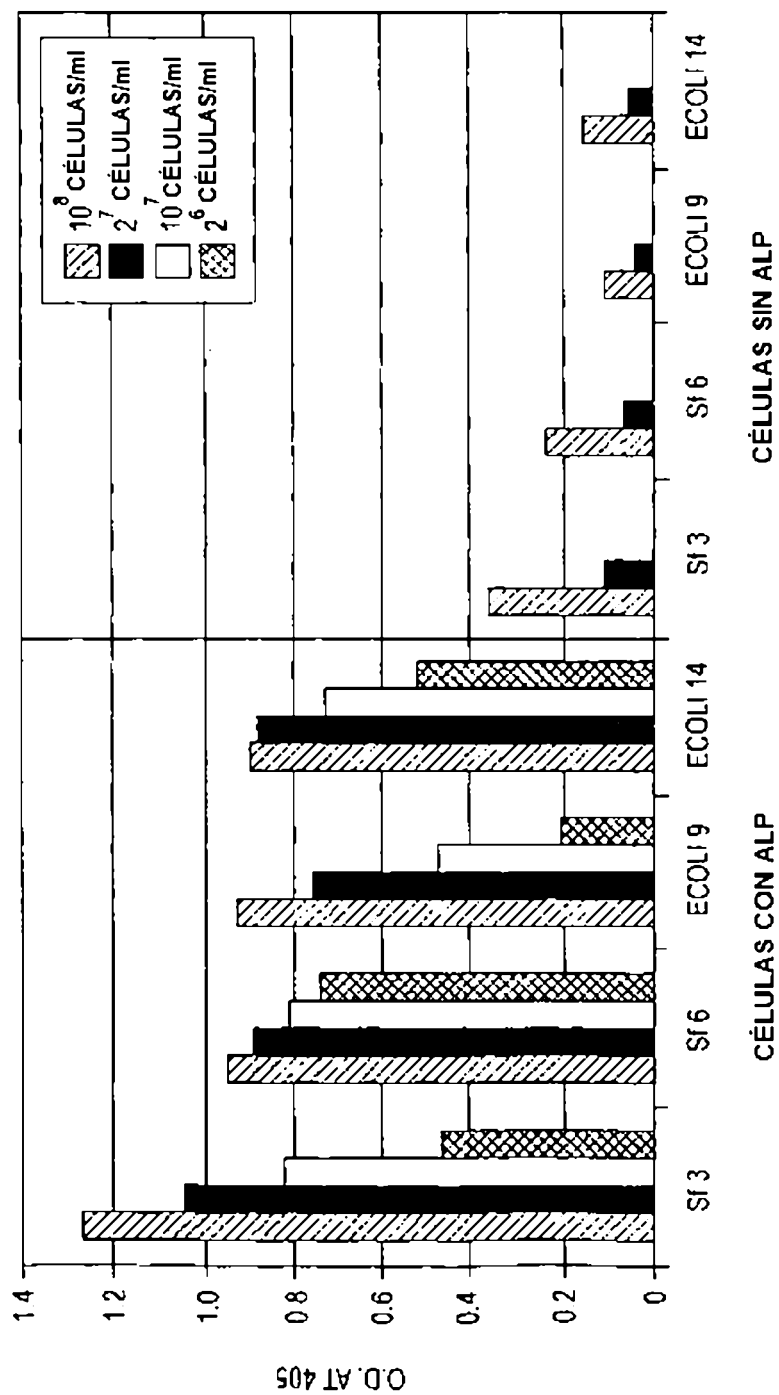


FIG. 2

ENLAZAMIENTO DE ALP DE DIFERENTES FUENTES A BACTERIAS

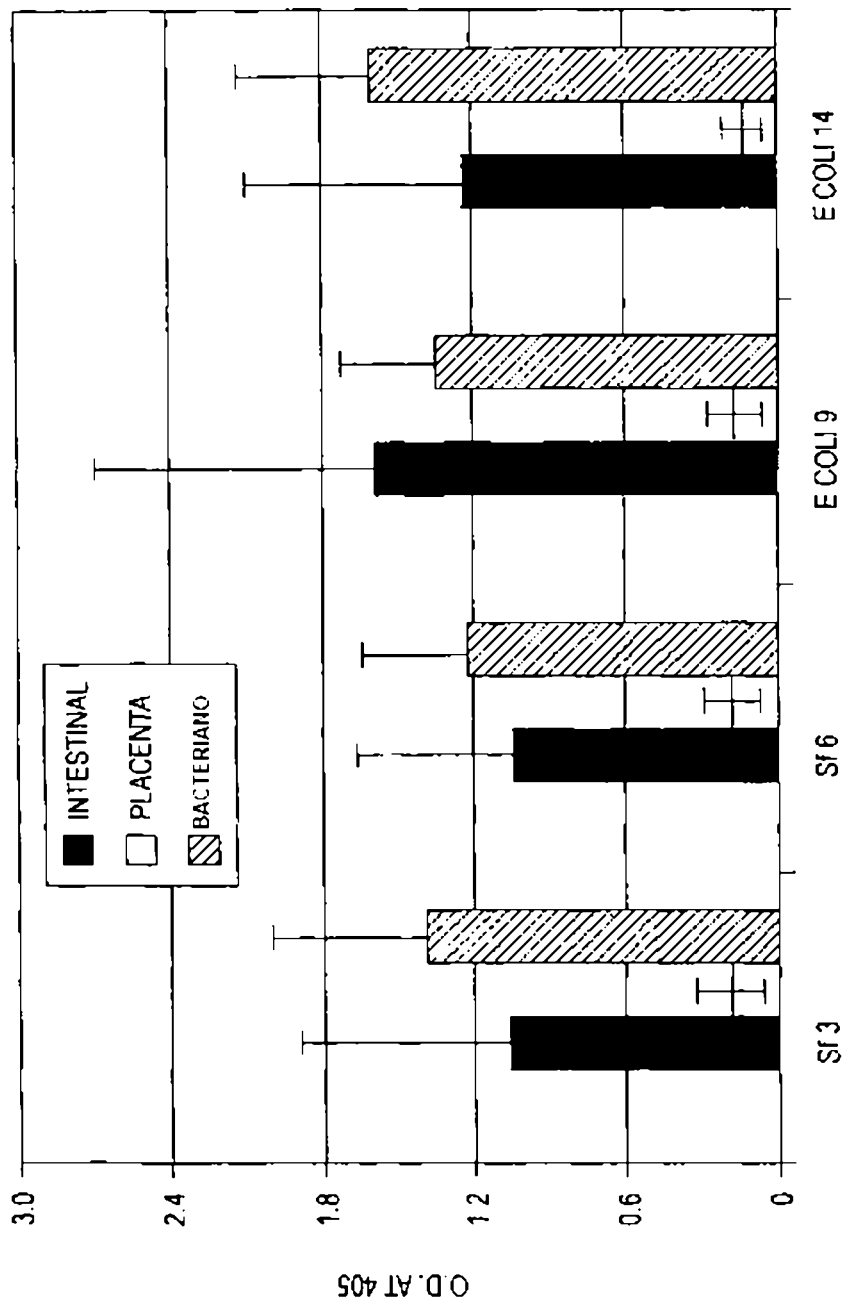


FIG. 3

EFFECTO DE CONCENTRACIONES DE ZINC SOBRE EL ENLAZAMIENTO DE ALP A BACTERIAS (STAPH#6)

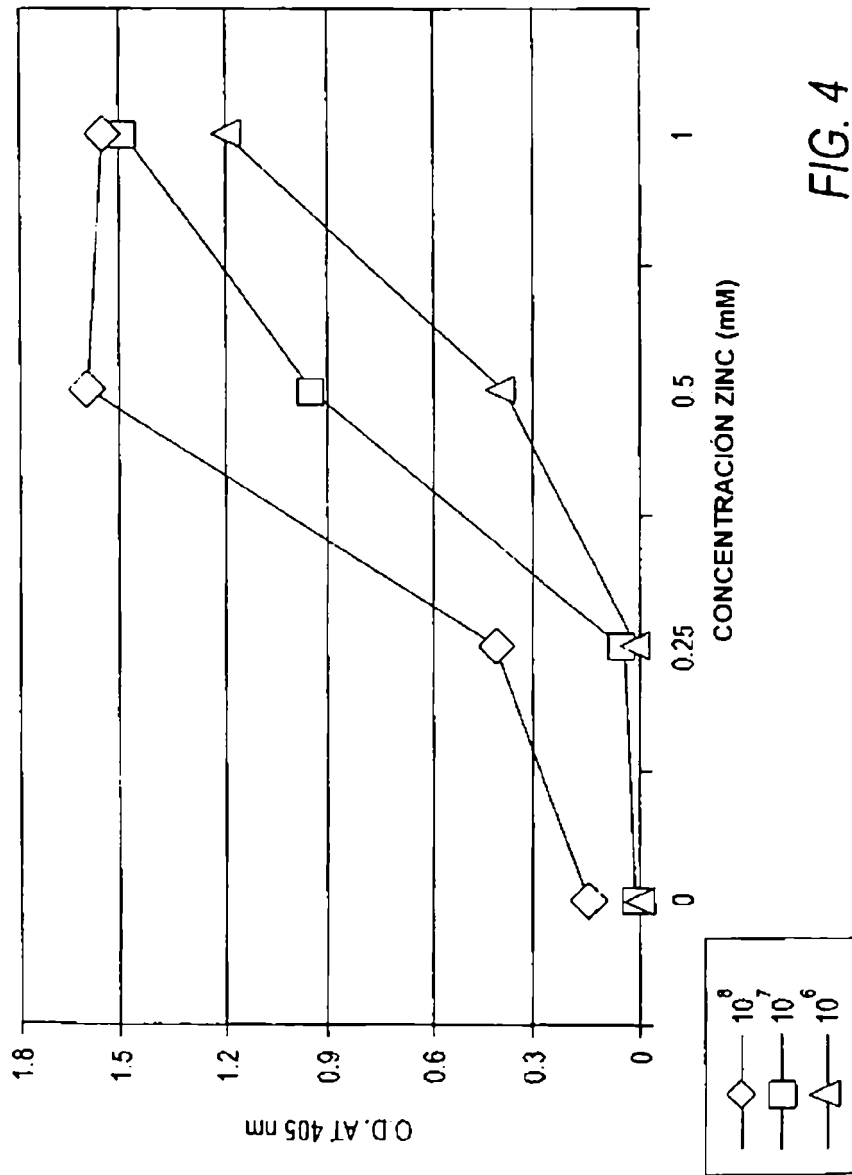


FIG. 4

ENLAZAMIENTO DE ALP A BACTERIAS EN PRESENCIA DE ZINC 1.0 mM

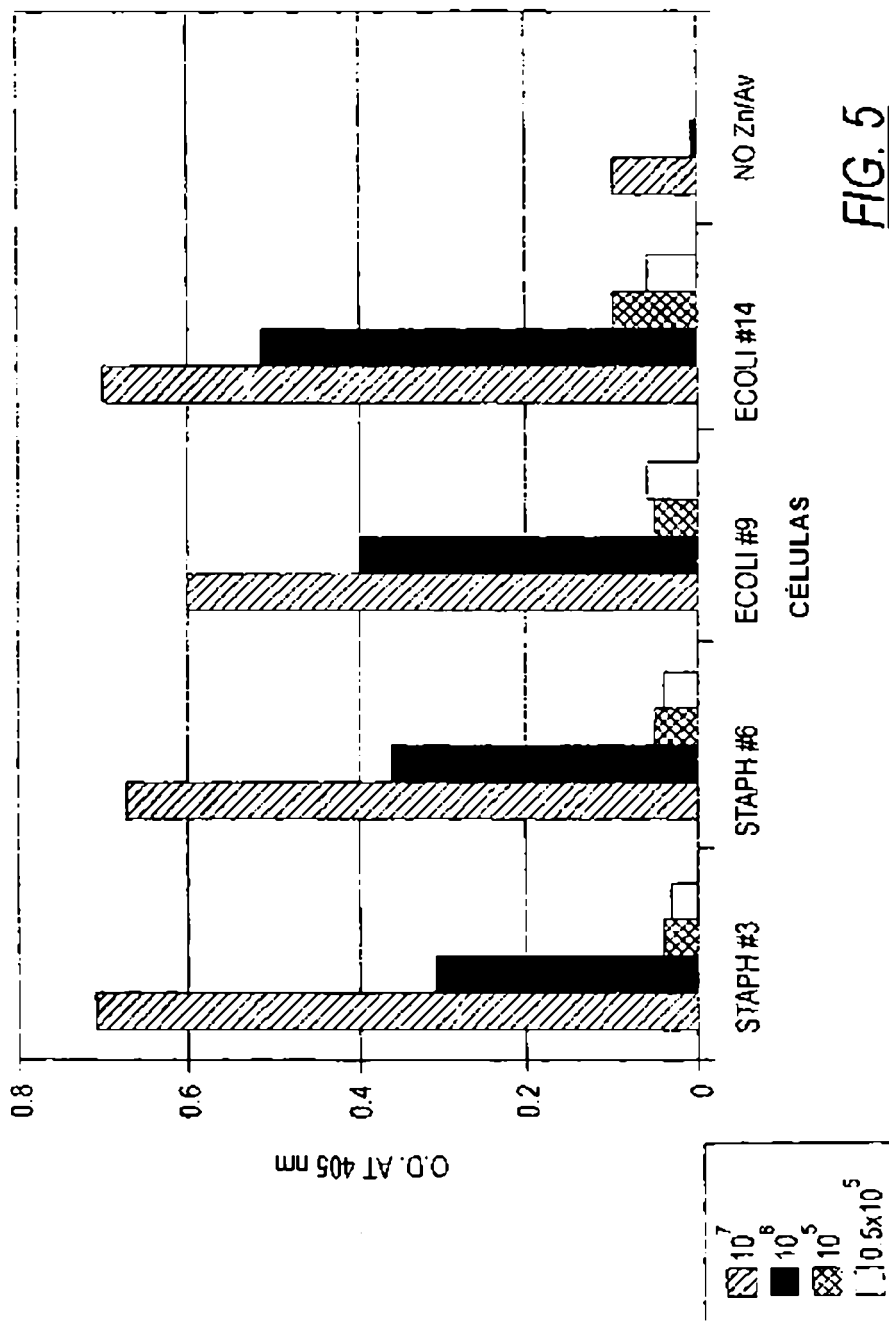


FIG. 5

EFFECTO DE CATIONES SOBRE ALP ENLAZADO A BACTERIAS

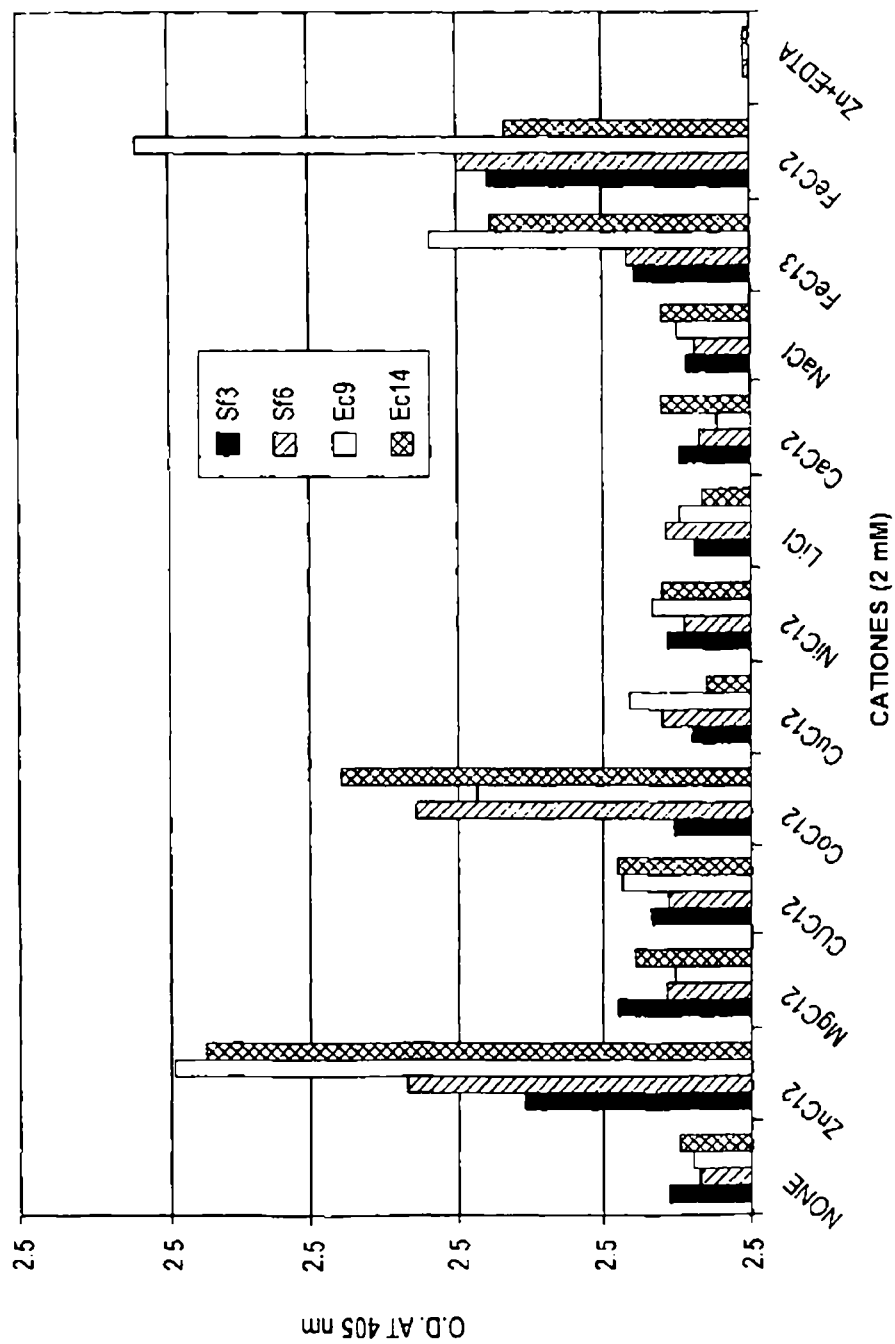


FIG. 6

EFFECTO DE Zn+2 SOBRE ENLAZAMIENTO DE PROTEINAS A BACTERIAS (E.COLI) A pH 9.9 EN REGULADOR DE GLICINA

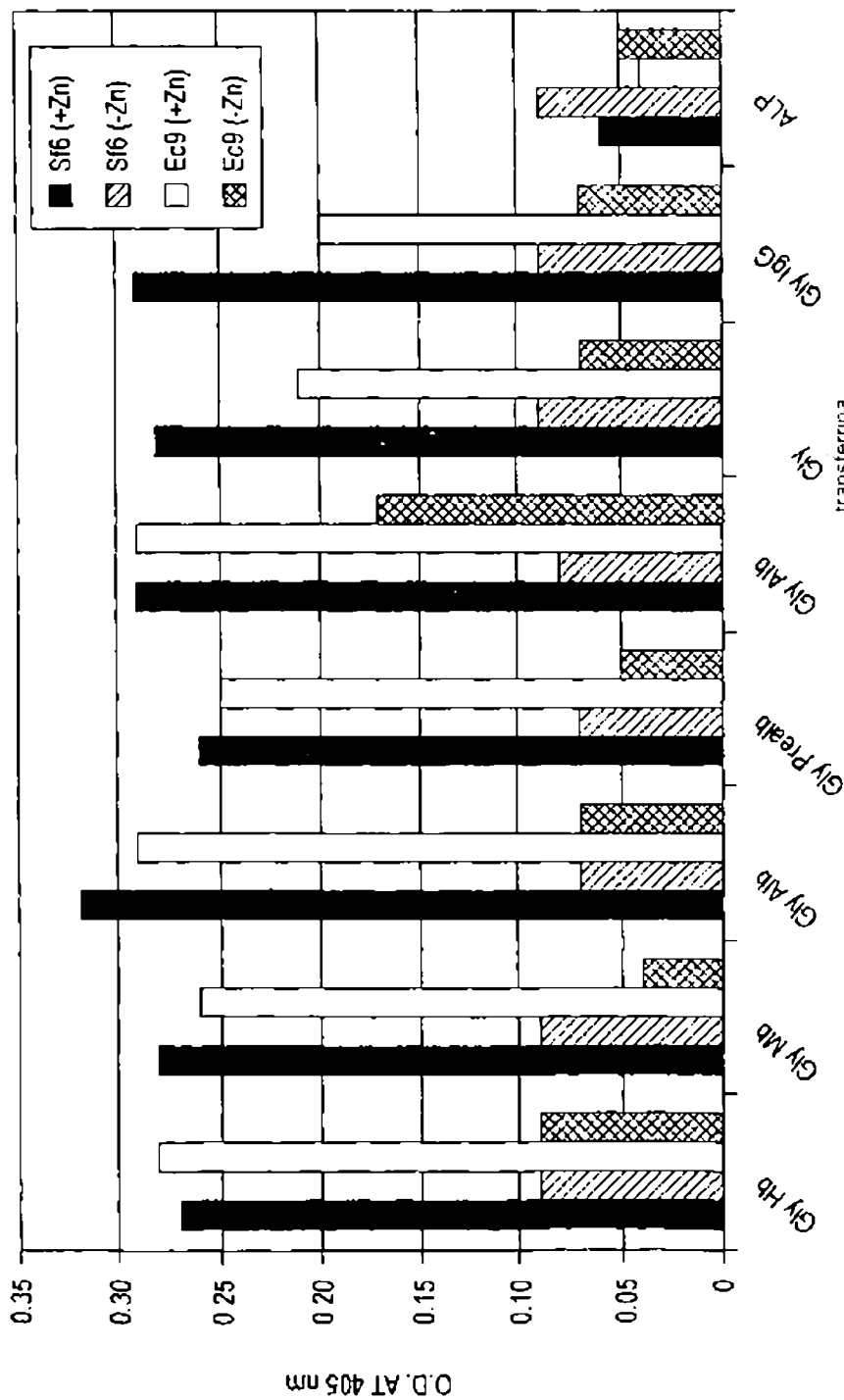


FIG. 7

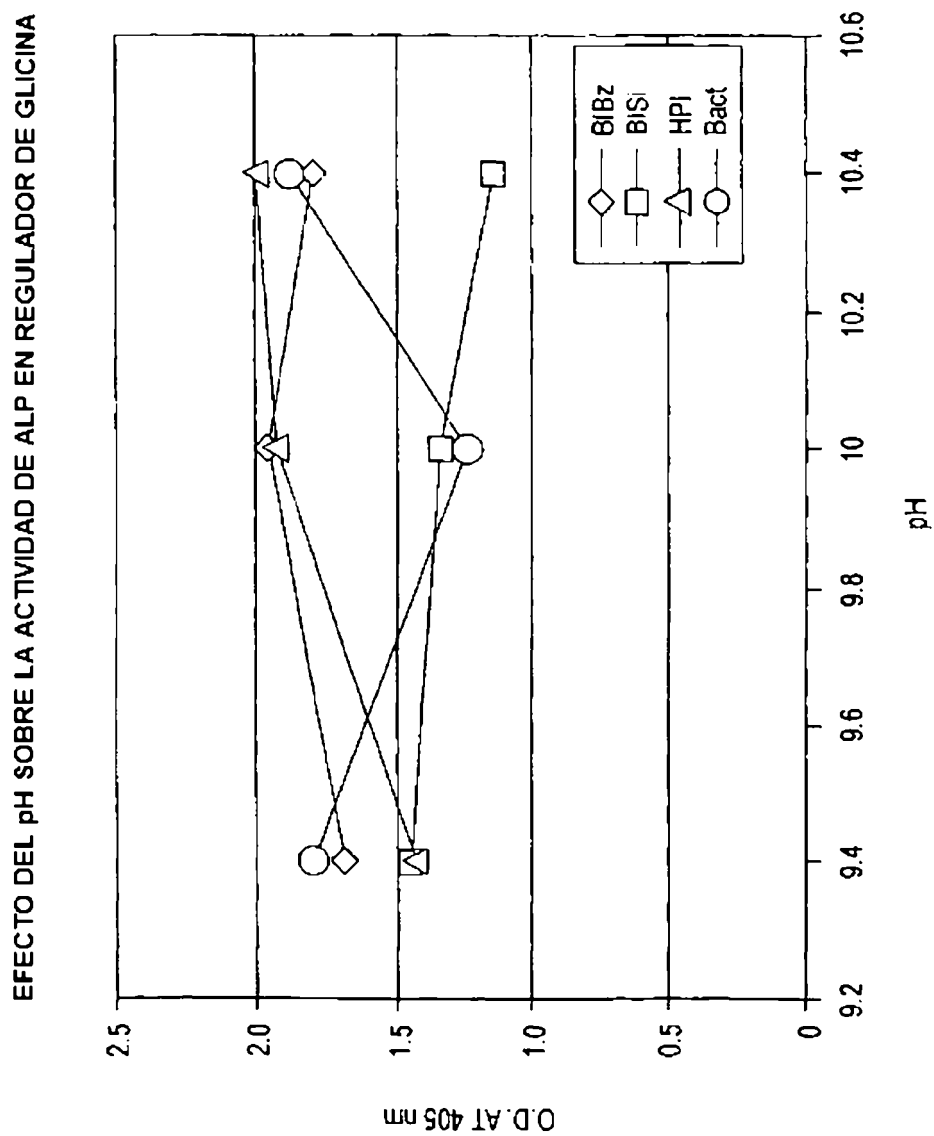


FIG. 8

EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALP EN REGULADOR DE BORATO

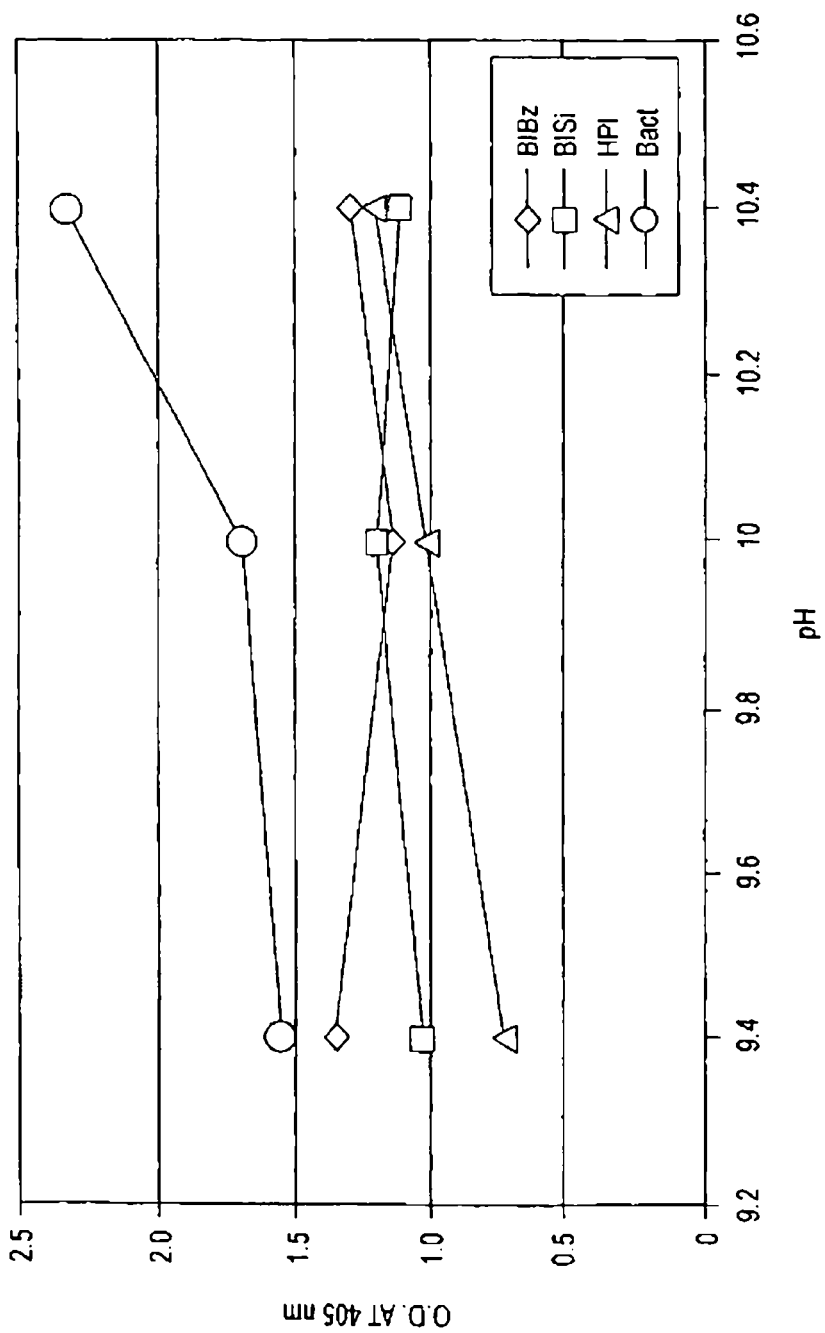


FIG. 9

EFEECTO DE DIFERENTES CATIONES SOBRE ENLAZAMIENTO DE ALP A BACTERIAS (STAPH.) A pH 9.9 EN REGULADOR DE GLICINA

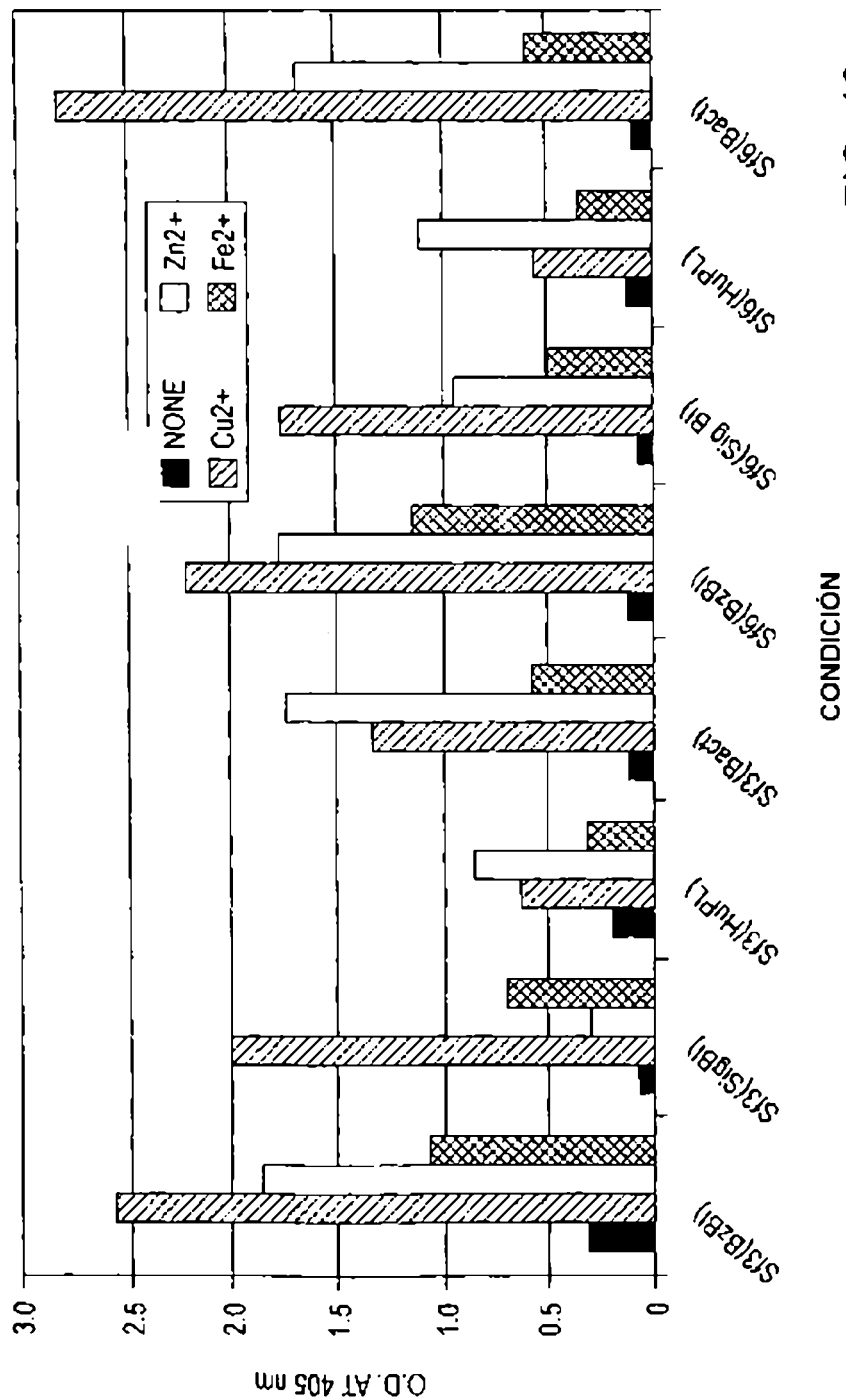


FIG. 10

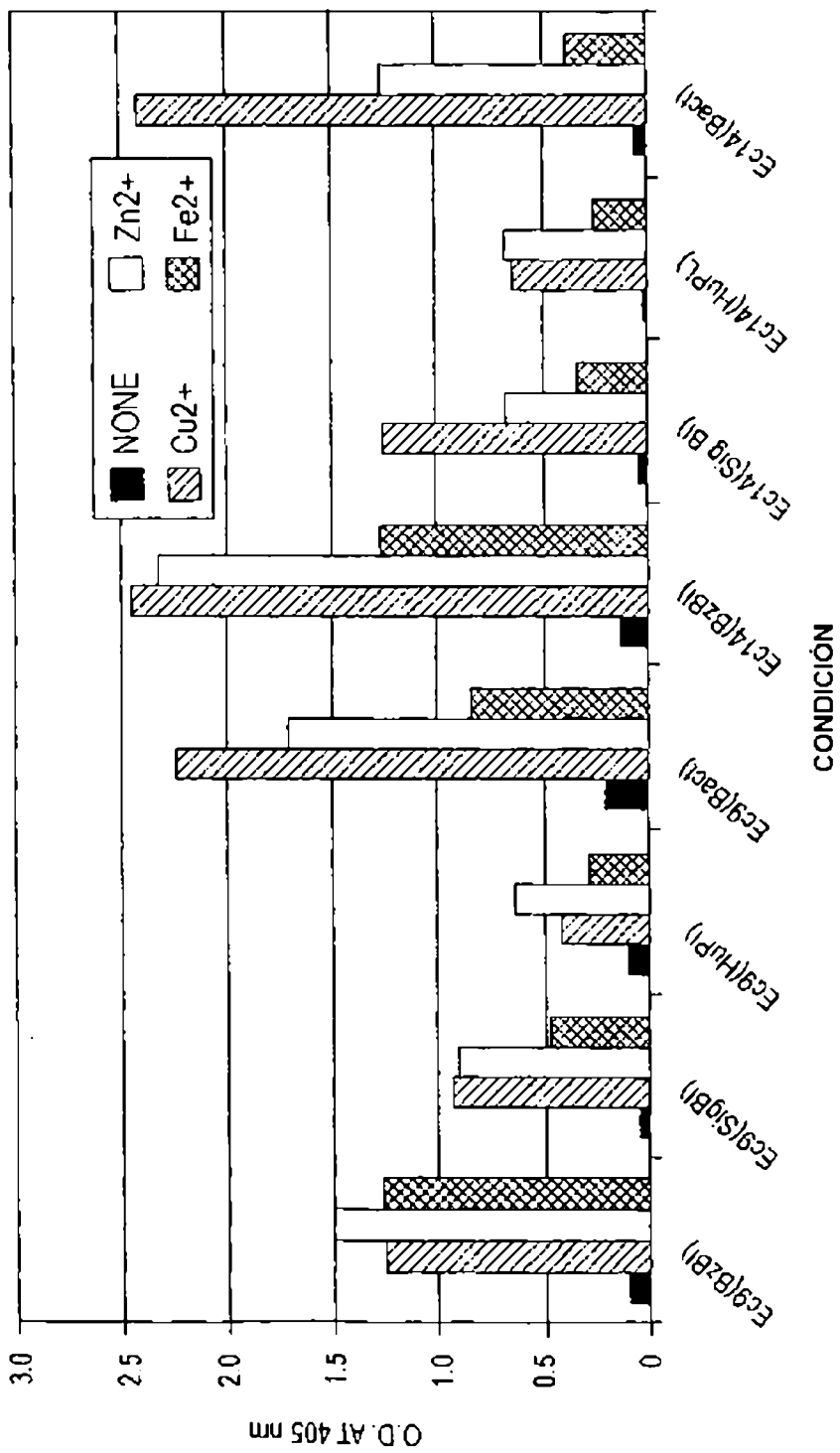


FIG. 11