



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①① Número de publicación: **2 200 611**

②① Número de solicitud: 200002781

⑤① Int. Cl.⁷: G01N 33/68

①②

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②② Fecha de presentación: **14.11.2000**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2004**

④③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.03.2004

⑦① Solicitante/s:
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
C/ Pedro Cerbuna, 12
50009 Zaragoza, ES

⑦② Inventor/es: **Lampreave Palacios, Fermín;**
Alava-Martínez de Contrasta, M^a Angeles;
González Ramón, M^a Nieves;
Piñeiro Pardo, Matilde y
Piñeiro Antón, Andrés

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Método de diagnóstico de procesos patológicos en mamíferos, así como de la calidad de la carne, leche y productos derivados en mamíferos no humanos.**

⑤⑦ Resumen:

Método de diagnóstico de procesos patológicos en mamíferos, así como de la calidad de la carne, leche y productos derivados en mamíferos no humanos, basado en la determinación inmunoquímica de la proteína MAP (Major Acute-phase Protein). La MAP es una proteína de fase aguda en diferentes especies de mamíferos no humanos, entre ellas la especie porcina, ovina, bovina, y la rata. MAP es también una proteína de fase aguda en la especie humana. Su concentración plasmática aumenta de 20 a 30 veces en la inflamación experimental provocada por la inyección de aceite de trementina en el caso del cerdo. Muestra una movilidad electroforética alfa-2 y un peso molecular aparente de 120,000. Pertenecce a la familia del inhibidor de tripsina inter-alfa. La concentración de MAP determinada por métodos inmunoquímicos aumenta durante la inflamación, las infecciones y el estrés (físico). Estas alteraciones afectan negativamente a la calidad de la carne y de la leche. La determinación inmunoquímica de la MAP tiene aplicaciones entre otras, como marcador del bienestar, de la salud, y de la calidad de la carne, la leche y productos derivados.

ES 2 200 611 A1

DESCRIPCION

Método de diagnóstico de procesos patológicos en mamíferos, así como de la calidad de la carne, leche y productos derivados en mamíferos no humanos.

La presente invención se enmarca dentro del campo de los métodos inmunoquímicos utilizables en Medicina, Veterinaria y en el control de calidad de alimentos.

Estado de la técnicaa) *Proteínas de fase aguda. MAP*

En numerosos procesos fisiopatológicos de mamíferos (inflamación, infecciones, quemaduras, lesiones graves y estrés agudo, entre otros) el patrón de las proteínas plasmáticas se modifica considerablemente (Baumann y Gauldie, *Immunology Today*, (1994), 15, 74-80) Para un grupo de estas proteínas, denominadas de fase aguda, la concentración plasmática aumenta de forma destacada, respecto de los valores normales, horas después de la iniciación del proceso patológico. La determinación de las proteínas de fase aguda tiene valor diagnóstico. Por ejemplo, el aumento en la concentración de la proteína C-reactiva en el suero sanguíneo humano es un marcador clínico de los procesos inflamatorios. El tipo de las proteínas de fase aguda, utilizables como marcadores clínicos, es distinto según las especies (Gruys, Obwolo y Toussaint, *Veterinary Bulletin*, (1994), 64, 1009-1018). En el caso bovino, se ha encontrado recientemente correlación positiva entre la cantidad de células somáticas, el contenido de lactosa, la conductividad eléctrica y la concentración de proteína C-reactiva en la leche procedente de vacas con procesos de inflamación en las ubres (Kruger y Neumann, (1999), 27, 164-167). En el caso del cerdo, se han observado aumentos en la concentración de la haptoglobina relacionados con rinitis atróficas, con infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, o después de la inyección de aceite de trementina (Gruys, Obwolo y Toussaint, *Veterinary Bulletin*, (1994), 64, 1009-1018; Lampreave, González-Ramón, Martínez-Ayensa, Hernández-Lorenzo, García-Gil y Piñeiro *Electrophoresis*, (1994), 15, 672-676). La proteína C-reactiva es también de fase aguda en los cerdos (Lampreave, González-Ramón, Martínez-Ayensa, Hernández-Lorenzo, García-Gil y Piñeiro, *Electrophoresis*, (1994), 15, 672-676; Bürger, Fennert, Pohle y Wesemeir *Journal of Veterinary Medicine Series A*, (1992), 39, 635-638).

En general, el estrés y los procesos inflamatorios, independientemente de sus causas afectan a la calidad de la carne. En particular, la denominada carne "pálida, blanda y exudativa", que afecta a un porcentaje superior al 25 % de los cerdos de matadero, se debe a esas situaciones patológicas (Adeola y Ball, *Journal of Animal Science*, (1992), 70, 1888-1894; Bendall y Swatland, *Meat Science*, (1988), 24, 85-126).

La proteína plasmática porcina cuya concentración aumenta más en procesos inflamatorios experimentales es una nueva proteína denominada MAP. Esta proteína también se detecta como proteína de fase aguda en sueros sanguíneos bovino, ovino, humano y de rata (González-Ramón, Alava, Sarsa, Piñeiro, Escartín, García-

Gil, Lampreave y Piñeiro, *FEBS Letters*, (1995), 371, 227-230; Piñeiro, Alava, González-Ramón, Osada, Lasierra, Larrad, Piñeiro y Lampreave, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1999), 263, 224-229; Carmona (1998) Tesis de Licenciatura, Universidad de Zaragoza; Sendino, (1998), Tesis de Licenciatura, Universidad de Zaragoza).

La proteína MAP, cuya determinación inmunoquímica aplicada al diagnóstico es el objeto de esta patente, se caracteriza:

i) porque en la inflamación experimental inducida en cerdos por la inyección subcutánea de aceite de trementina o por trauma quirúrgico, su concentración plasmática aumenta a las 24-48 horas de esos tratamientos (Lampreave, González-Ramón, Martínez-Ayensa, Hernández-Lorenzo, García-Gil y Piñeiro, *Electrophoresis*, (1994), 15, 672-676; González-Ramón, Alava, Sarsa, Piñeiro, Escartín, García-Gil, Lampreave y Piñeiro, *FEBS Letters*, (1995), 371, 227-230). La concentración de la proteína en los animales de experimentación antes del tratamiento varía entre 0.3 y 0.6 mg/ml. En los animales tratados, la concentración de Pig-MAP se eleva entre 20 y 30 veces respecto de los valores normales. La concentración plasmática de la proteína alcanza de nuevo los valores basales a los 10 o 12 días después de la iniciación del proceso inflamatorio o quirúrgico.

ii) por presentar un peso molecular aparente próximo a 120,000, determinado por electroforesis reductora en geles de poliacrilamida (8-10 % de monómero) en presencia de 0,1 % de dodecil sulfato sódico (SDS). En sueros sanguíneos envejecidos se detectan fragmentos de la proteína de pesos moleculares entre 80,000 y 30,000.

iii) por tener una movilidad electroforética alfa-2, determinada por inmunoelectroforesis cruzada en geles de agarosa (1 %) preparados en tampón 4.48 g/L TRIS, 5.05 g/L veronal sódico, 0.11 g/L lactato cálcico, pH 8.4. Esa movilidad es prácticamente coincidente con la de la variante lenta de la alfa-2-macroglobulina porcina.

iv) porque la secuencia NH₂-terminal de aminoácidos conocida (González-Ramón, Alava, Sarsa, Piñeiro, Escartín, García-Gil, Lampreave y Piñeiro, *FEBS Letters*, (1995), 371, 227-230) muestra homología moderada (50 %) con la cadena pesada H2 de otra proteína plasmática humana denominada "Inhibidor de tripsina interalfa" (SWISS-PROT Protein DataBase). La Pig-MAP es además la proteína de cerdo homóloga de la proteína humana denominada PK-120 (Nishimura, Kakizaki, Muta, Sasaki, Pu, Yamashita y Nagasawa, *FEBS Letters*, (1995), 357, 207-211) o IHRP (Saguchi, Tobe, Hashimoto, Sano, Nakano, Miura y Tomita, *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, (1995), 117, 14-18).

v) porque su concentración sérica aumenta más de diez veces en animales con procesos infecciosos inducidos experimentalmente (en cerdos infectados con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en vacas con mastitis de verano) (Heegaard, Klausen, Nielsen, González-Ramón, Piñeiro, Lampreave y Alava, *Comp. Biochem. Physiol.* (1998), 119B (2), 365-373; Carmona (1998) Tesis de Licenciatura. Universidad de Zaragoza).

vi) porque su expresión, en el caso porcino y

humano, está regulada positivamente por la interleuquina 6. Es, por tanto, una proteína de fase aguda positiva tipo II (Piñeiro, Alava, González-Ramón, Osada, Lasierra, Larrad, Piñeiro y Lampreave, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1999), 263, 224-229; González-Ramón, Hoebe, Alava, van Leengoed, Piñeiro, Carmona, Iturralde, Lampreave y Piñeiro, *Eur. J. Biochem.*, (2000), 276, 1878-1885)

b) *Métodos inmunoquímicos de cuantificación*

La cuantificación de una proteína individual en una mezcla cómpleja, por ejemplo en el suero sanguíneo, puede realizarse por métodos inmunoquímicos si se dispone de moléculas ligaduras que reconozcan de forma específica a la proteína a determinar. Entre estas moléculas ligaduras destacan los anticuerpos, ya sean policlonales (antisueros) o monoclonales, o fragmentos de los mismos que retengan la capacidad de reconocimiento específico (entre ellos fragmentos Fc). Los antisueros o los anticuerpos monoclonales, se obtienen, en condiciones apropiadas, en un animal distinto al del origen de la proteína, la proteína purificada, fragmentos de ella o péptidos sintéticos con la misma secuencia que la proteína o secuencias derivadas de la misma con la misma actividad biológica. Los anticuerpos específicos o los anticuerpos monoclonales se pueden purificar y aislar mediante técnicas de afinidad, utilizando la proteína purificada o no, fragmentos de ella o péptidos sintéticos como moléculas ligaduras. Asimismo los anticuerpos se pueden purificar por otras técnicas de afinidad entre las que se encuentran la afinidad con proteína A insolubilizada.

Entre los métodos inmunoquímicos cuantitativos cabe mencionar los siguientes:

- La inmunodifusión radial (Mancini, Carbonara y Heremans, *Immunochemistry*, (1965), 2, 235-254), que se basa en la utilización de geles de espesor uniforme que contienen las moléculas ligaduras (por ejemplo, antisueros, anticuerpos específicos o mezclas de anticuerpos monoclonales). Los geles se pueden preparar con agar-agar, agarosa o con otros polímeros naturales o sintéticos en tampones de pH próximos a la neutralidad. Cuando las muestras que contienen la proteína a cuantificar se aplican en pocillos practicados en el gel, al difundir la proteína se producen círculos de precipitación cuya área es proporcional a la concentración de la proteína.

- La electroinmunodifusión (Laurell, *Analytical Biochemistry*, (1966), 15, 45-52) se basa en la difusión forzada eléctricamente en geles preparados como en el apartado anterior. En este caso se producen cohetes o triángulos de precipitación, cuya área es también proporcional a la concentración de la proteína en las muestras.

- Métodos basados en la dispersión de la luz (Price y Newman, *Principles and practise of immunoassay*, (1991), Ed. Stockton Press, Nueva York). Estos métodos consisten en la formación de complejos antígeno (proteína a cuantificar) - moléculas ligadoras (mencionadas poco antes), cuando se mezclan soluciones de estas moléculas ligadoras con muestras que contienen la proteína a cuantificar. La proteína y las moléculas ligadoras, por ejemplo los anticuerpos, pueden estar inicialmente en forma soluble o asociados

con partículas, preferiblemente de latex. La formación de inmunocomplejos se puede detectar por turbidimetría, midiendo la pérdida de intensidad de la luz incidente debida a la dispersión; por nefelometría, en la que se determina la luz dispersada mediante un fotodetector situado a un determinado ángulo respecto de la luz incidente; y por conteo de partículas, seleccionando apropiadamente los ángulos de dispersión de la luz.

- Métodos inmunoenzimáticos en fase sólida. Cuando se requiere mayor sensibilidad se pueden utilizar métodos inmunoenzimáticos en fase sólida, como el denominado ELISA (Ternyinc y Avrameas, *Técnicas Inmunoenzimáticas*, (1989), Grupo Editorial Iberoamérica, México). Estos métodos se basan en la insolubilización de las moléculas ligadoras, preferentemente los anticuerpos, o de los antígenos mediante su adsorción sobre superficies sólidas. La formación de los inmunocomplejos (después de la adición del antígeno, en el presente caso las muestras que contengan la proteína MAP, o del anticuerpo, en su caso) se pueden medir mediante la adición de una segunda molécula de detección, frecuentemente una molécula ligados, y preferentemente un anticuerpo o fragmento del mismo, unida covalentemente a una enzima u otra molécula con capacidad de producir señal detectable espectroscópicamente. Si se utiliza una enzima como molécula de detección, la actividad enzimática asociada es proporcional a la cantidad de antígeno (en el presente caso, la proteína MAP) en la muestra.

Del mismo modo que en la inflamación experimental o en el trauma quirúrgico, la concentración plasmática o sérica de la MAP aumenta mucho en diversos procesos patológicos. Por ejemplo en el caso de la especie porcina, patologías tales como: infección por el virus de Aujeszky, síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), infección por bacterias como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, abortos patológicos, estrés agudo, y otros. Todos ellos afectan a la salud de los animales, al rendimiento en la producción y a la calidad de la carne. La determinación de la MAP en muestras de plasma o suero sanguíneo, en otros fluidos fisiológicos como la leche o la orina, en exudados orgánicos y en tejidos sólidos o en extractos tisulares es, por consiguiente, de utilidad como marcador clínico-sanitario tanto de los procesos patológicos como de la calidad de la carne y de la leche y de sus productos derivados.

La aplicación descrita en esta invención se basa en utilizar métodos inmunoquímicos en la determinación de la mencionada proteína, MAP, en muestras procedentes de mamíferos. Para ello, es preciso disponer de moléculas ligadoras de la proteína, que como ya se ha mencionado pueden ser antisueros, anticuerpos específicos o anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos contra la proteína MAP, fragmentos de ella o péptidos sintéticos derivados de su secuencia.

Los antisueros o los anticuerpos monoclonales contra MAP, fragmentos de ella o péptidos sintéticos, se obtienen de preferencia en animales de otra especie.

Para purificar MAP se puede partir de plasma o de suero sanguíneo, preferentemente de fase

aguda.

El aislamiento de la MAP se puede realizar mediante la combinación de varias técnicas, una de las cuales se menciona a continuación a modo de ejemplo ilustrativo (González-Ramón, Alava, Sarsa, Piñeiro, Escartín, García-Gil, Lampreave y Piñeiro, FEBS Letters, (1995), 371, 227-230): a) se obtiene una fracción del material de partida de peso molecular de alrededor de 120,000 utilizando cromatografía en geles filtrantes; b) la MAP presente en la fracción anterior se adsorbe en azul de Cibacrón insolubilizado y se eluye aumentando la concentración salina del sistema; c) la fracción eluída del azul de Cibacrón se somete a cromatografía de intercambio iónico con resinas que contengan el grupo dietilaminoetil (DEAE), y d) las fracciones que contienen únicamente MAP se seleccionan después de su análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

- La medida inmunoquímica de la concentración de la MAP puede llevarse a cabo utilizando antiseros o anticuerpos específicos por los métodos siguientes: inmunodifusión radial, electroinmunodifusión, métodos de dispersión de la luz o por Métodos inmunoenzimáticos en fase sólida entre otros, cuyos fundamentos se han descrito poco antes en este texto.

Ejemplo

En una realización preferida de esta invención que se acaba de describir, que no limita el alcance de la invención sino se muestra como caso ilustrativo de una realización posible dentro del alcance de la invención, la MAP se aísla de suero sanguíneo de cerdo en fase aguda. Ésta se provocó inyectando a los cerdos por vía subcutánea aceite de trementina en la proporción de 0.2 a 0.3 ml/kg de peso corporal. Los cerdos se sangraron, bajo anestesia, a las 24-48 horas de la inyección. La sangre se dejó coagular espontáneamente y el suero se obtuvo después de la centrifugación moderada de la sangre coagulada. Alícuotas del suero sanguíneo se fraccionaron por filtración en Sephadex G-150, equilibrado en tampón 0.05M TRIS-HCl 0.02M NaCl, pH 7.5. Se seleccionó la fracción de peso molecular alrededor de 120,000. Esta se somete a cromatografía de afinidad con

el colorante Azul de Cibacrón insolubilizado en Sepharose-4B. La proteína MAP se fija al colorante en estas condiciones, mientras que otras proteínas séricas se excluyen. Después de lavar con el tampón mencionado, la MAP se separa del colorante aumentando la concentración salina del tampón hasta 0.5M NaCl. La fracción obtenida, enriquecida en MAP, se dializa frente a 0.05M TRIS-HCl, 0.02M NaCl, pH 7.5 y se somete a cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex-A50. Las proteínas se eluyen mediante un gradiente salino. Las fracciones eluídas se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS para seleccionar las que únicamente contienen la banda de peso molecular 120,000.

La proteína purificada, previamente emulsionada con un volumen igual de adjuvante completo de Freund, se inyecta subcutáneamente en varios puntos de la región dorsal en conejos, a unas dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal. Después de 3-4 semanas, se realizan inyecciones de recuerdo con la misma cantidad de proteína, emulsionada con adjuvante incompleto de Freund. A las dos semanas se sangran los animales para obtener los antiseros específicos.

Para determinar la concentración de la proteína MAP en muestras de suero o plasma se utiliza, por ejemplo, inmunodifusión radial. Para ello, se preparan geles de agarosa al 1% y de espesor uniforme en un tampón de pH neutro, que contienen una cantidad apropiada del antisuero específico anti-MAP. En los geles se practican pocillos, preferentemente de unos 3 mm de diámetro, separados entre sí al menos 1.5 cm. En cada pocillo, se introducen de 5 a 10 μL de muestras patrón (la proteína purificada o un suero de fase aguda, previamente valorado), que contengan MAP a concentraciones, preferentemente entre 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se aplican, asimismo, muestras problema a diluciones apropiadas, que para la mayor parte de los casos varían entre 1/10 y 1/300. Los geles se mantienen en posición horizontal y en cámara húmeda, preferentemente durante 24 a 48 horas. Se forman círculos de precipitación cuya área es proporcional a la concentración de la proteína.

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico de procesos patológicos en mamíferos, así como de la calidad de la carne, leche y productos derivados en mamíferos no humanos, basado en el uso de la determinación inmunoquímica de la proteína MAP, fragmentos de ella o péptidos sintéticos derivados de su secuencia mediante la utilización de moléculas ligadoras de la proteína MAP, o de fragmentos de ella o de péptidos sintéticos derivados de la secuencia de MAP.

2. Método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la determinación inmunoquímica es la inmunodifusión radial o la electroinmunodifusión cuantitativa o la turbidimetría, nefelometría o contaje de partículas (preferiblemente de latex) después de la formación de complejos de la MAP con moléculas ligadoras.

3. Método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la determinación inmunoquímica está basada en la formación o en la inhibición del complejo MAP/moléculas ligadoras, siempre que uno de ellos se haya inmovilizado previamente en soporte sólido.

4. Método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la determinación inmunoquímica del complejo MAP/moléculas ligadoras se determina en una segunda o posterior fase mediante la adición de moléculas ligadoras, el propio antígeno, moléculas capaces de formar complejos de afinidad (avidina streptavidina, biotina u otras) acoplados a moléculas que produzcan señal detectable analíticamente.

5. Método de diagnóstico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que las moléculas ligadoras de la proteína MAP son anticuerpos monoclonales, y/o anticuerpos policlonales, y/o fragmentos de los mismos con capacidad de reconocimiento específico de la proteína MAP, sus fragmentos o péptidos sintéticos derivados de su secuencia y/o lectinas.

6. Uso de métodos de diagnóstico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, aplicados a la determinación de MAP en fluidos fisiológicos, exudados orgánicos, extractos de tejidos o en tejidos sólidos procedentes de individuos o animales sanos, enfermos o con alteraciones fisiológicas transitorias.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



① ES 2 200 611

② N.º solicitud: 200002781

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.11.2000

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: G01N 33/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2128948 A1 (UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA) 16.05.1999, todo el documento.	1-6
X	WO 9309142 A1 (UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN) 13.05.1993, todo el documento.	1-6
Y		1-6
X	TOUSSAINT, M.J.M. et al. "Implication of Clinical Pathology in Assessment of Animal Health and in Animal Production and Meat Inspection". COMP. HAEMATOL. INT., Vol. 5, 1995. Páginas 149-157. Todo el documento, especialmente la discusión.	1-6
Y		1-6
Y	GONZÁLEZ-RAMÓN, N. et al. "The major acute phase serum protein in pigs is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120". FEBS. LETTERS, Vol. 371, 1995. Páginas 227-230. Todo el documento.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

16.01.2004

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1