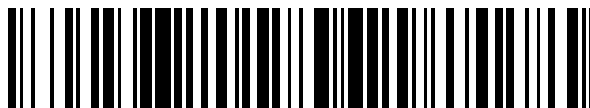


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 796**

21 Número de solicitud: 201300775

51 Int. Cl.:

C12Q 1/32 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.07.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.01.2015

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (100.0%)
OTRI-UAL, Ctra. de Sacramento, s/n Edf. Central,
planta baja
04120 Almería ES

72 Inventor/es:

GARCÍA CAMACHO , Francisco ;
SÁNCHEZ MIRÓN , Asterio ;
GALLARDO RODRÍGUEZ , Juan José ;
LÓPEZ ROSALES , Lorenzo y
MOLINA GRIMA , Emilio

54 Título: **Método para la cuantificación fluorimétrica de la enzima LDH en disolución**

57 Resumen:

Método para la cuantificación fluorimétrica de la enzima LDH en disolución.

La invención está dirigida al desarrollo de un método y creación de un kit para la cuantificación del efecto citotóxico y/o viabilidad celular ante agentes químicos (elemento, compuesto, mezcla o fármaco en cualquier de sus estados) y/o físicos (i.e. iluminación, temperatura, turbulencia, fluidodinámica, etc.) que puedan producir rotura de la membrana celular. El kit mide la liberación de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) proveniente de células muertas y/o lisadas. Esta enzima cataliza la oxidación del lactato, presente en el kit, a piruvato. Durante la reacción, el NAD⁺, también presente en el kit, es reducido a NADH. La concentración de LDH, se cuantifica a través de la fluorescencia del NADH formado. Las mediciones indirectas de la enzima LDH se realizan en el sobrenadante de cultivos celulares. El método es aplicable tanto en medios inorgánicos para microalgas como en medios comerciales para células animales y de insecto.

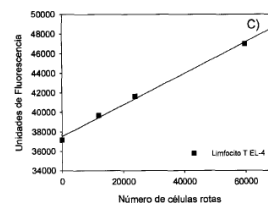


Figura 4.

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN FLUORIMÉTRICA DE LA ENZIMA LDH EN DISOLUCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al desarrollo de un procedimiento para la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en disolución acuosa mediante técnicas fluorimétricas. El procedimiento desarrollado podrá utilizarse para cuantificar concentraciones de la enzima LDH sea cual sea su origen. Se podrán preparar kits para hacer más práctica y comercializable la aplicación de la invención.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

 Los procedimientos actuales para determinar concentraciones de enzima LDH en disolución son aplicados principalmente al análisis clínico y a la determinación de la viabilidad celular en cultivos celulares. Existen además métodos de cuantificación que se
15 basan en principios parecidos y que suelen ser comercializados en forma de kits.

 Muchos de los métodos para cuantificación clínica se basan en la oxidación del lactato a piruvato por la acción de la enzima LDH, y la reducción de la forma oxidada del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) a su forma reducida (NADH) (ver Figura 1). La concentración de NADH generada se sigue por espectrofotometría de
20 absorción y la concentración de LDH se correlaciona con la concentración de NADH generado.

Así, se pueden encontrar en el mercado los siguientes kits basados en la reacción y el método de detección antes mencionados: «Reactivo LDH-L» de Thermo Fischer Scientific, Inc.; kit «Ref.7096» de Far Diagnostics, SRL.; «Lactate dehydrogenase Reagent Set» de Pointe Scientific, Inc.; «LDH liqui-V» de Stanbio Laboratory. La metodología empleada en
5 todos estos kits presenta dos importantes inconvenientes: la espectrofotometría de absorción es una técnica poco sensible y en el máximo de absorción del NADH absorben otras sustancias orgánicas como los compuestos nitrogenados. Faltaría, por tanto, el desarrollo de un método de cuantificación que se basase en una técnica de detección más sensible y selectiva.

10 Los métodos para determinar la viabilidad o respuesta citotóxica de células expuestas a un tóxico, o a determinadas condiciones de cultivo, son claves para la investigación farmacéutica, medioambiental, en tests de pesticidas, biotecnología en general, etc. La determinación de la viabilidad celular para evaluar cualquier tipo de exposición necesita de un método preciso, rápido y fiable.

15 Los métodos más comunes para cuantificar la viabilidad celular se basan en la capacidad de la membrana de las células viables de excluir ciertos marcadores como el azul de trypan o yoduro de propidio. Por tanto, las células viables no se tiñen con dichos marcadores. Por el contrario, células muertas o en fase de muerte, que han perdido la integridad de la membrana celular, permiten el paso de estos marcadores al citoplasma
20 donde se unen a varias moléculas u orgánulos celulares marcándolos y permitiendo así la distinción entre células viables y no viables.

Otros métodos para determinar viabilidad celular se basan en la alteración de propiedades físicas y/o químicas de un determinado marcador, en función de cambios celulares; por ejemplo, alteración del espectro de absorción de radiación electromagnética. Por tanto, siguiendo el grado de conversión del marcador de un estado a otro se puede

5 cuantificar la viabilidad celular. La mayoría de este tipo de marcadores, como las sales de tetrazolio, tienen grupos aceptores de electrones. Estas incluyen el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltreazolio), XTT (hidrato ácido de 3'-{(1-fenilamino-carbonil)-3,4-treazolio}-bis(4-metoxi-6-nitro) benceno sulfónico) y el MTS (sal de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tretrazolio). Un método

10 típico para medir viabilidad celular usando MTS fue descrito por Buttke y col. (J. Immunol. Meth. **1993**, 157: 233-240).

Las células no viables que han perdido la integridad celular también liberan componentes citoplasmáticos al medio. La medida de la concentración de dichos componentes en el medio permite determinar el progreso de la muerte celular. Uno de estos

15 métodos se basa en la medida de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (Corey y col., J. Immunol. Meth. **1997**, 207:43-51) mediante la producción de trifosfato de adenosina (ATP).

Una gran cantidad de reacciones redox del metabolismo celular responsable de la generación de energía utilizan NADH o la forma reducida de la nicotinamida adenina

20 dinucleótido fosfato (NADPH) como donadores de protones (Dunningan y col., Biotechniques **1995**, 19:640-649). Aunque, en teoría, podría seguirse la concentración de estas dos especies espectrofotométricamente, su determinación directa mediante esta

técnica es difícil porque existen numerosas sustancias celulares que absorben luz cerca de la longitud que corresponde al máximo de absorción para NADH y NADPH (256 nm); por ejemplo, NAD^+ , NADP^+ , RNA y la mayoría de las proteínas tienen máximos de absorción alrededor de los 260 nm.

5 Buttke y col. (J. Immunol. Meth. **1993**,157: 233-240) describen cómo se usa el MTS para medir la reducción causada por las células vivas mediante el cambio de absorbancia desde la forma oxidada a la reducida del MTS. La combinación de MTS y el agente transferente de electrones (PMS) es un método útil para el seguimiento y cuantificación del NADH y NADPH en sistemas libres de células.

10 Bergmeyer y Bernt (Enzymol. biol clinic. **1965**, 19:65-76) describen un método para cuantificar LDH liberada por las células muertas midiendo la oxidación del β -NADH a β -NAD⁺ cuando la enzima LDH reduce el piruvato a lactato. La conversión del β -NADH a β -NAD⁺ se sigue por una disminución en la absorbancia a 340 nm. Dicha disminución es proporcional a la cantidad de LDH presente.

15 Moran y Schnellmann (J. Pharmacol. Toxicol. Methods **1996**, 36 (1):41-44) proponen una modificación del método de Bergmeyer y Bernt (1963). El método propuesto es no homogéneo (es decir, se aplica al sobrenadante libre de células) y mide el descenso que se produce en la fluorescencia del NADH al transformarse en NAD^+ . Este método es más sensible y más barato que el de Bergmeyer y Bernt (1965) puesto que usa menos
20 reactivos, especialmente NADH, ya que la fluorimetría es más sensible que la espectrofotometría.

Deutsch (1970, US Pat. 3,539,453) desarrollaron kits en estado anhidro para la determinación de LDH. El primer kit utiliza piruvato sódico como sustrato, la forma reducida del difosfopiridina nucleótido (DPNH) como coenzima y el manitol como estabilizante. El piruvato es transformado por la LDH en presencia de DPNH a lactato produciendo DPN^+ . La producción de DPN^+ se determina colorimétricamente a la longitud de onda de 340 nm.

Un segundo kit utiliza lactato de litio como sustrato, DPN^+ como coenzima y manitol como estabilizador. En este caso el lactato es transformado a piruvato por la LDH reduciendo la DPN^+ a DPNH. La producción de DPNH y, por tanto, la cantidad de LDH presente en la muestra se determina colorimétricamente a 340 nm.

Basados en las técnicas anteriores, se pueden encontrar varios kits comerciales para determinar rotura o lisis celular. Así, Molecular Probes (Life Technologies Corp.) vende kits para viabilidad celular basados en Resazurin, MTT y XTT. Esta compañía también comercializa "Vybrant" y el "Citotoxicity Assay Kit". Vybrant detecta la liberación de la enzima citoplasmática glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) por las células muertas y no viables. Este método detecta la enzima por medio de un proceso de dos fases que lleva a la reducción de resazurin a resorufin. Según las recomendaciones del fabricante (Flier n°. mp-23111), periodos de incubación superiores a 24 horas suponen una importante degradación de la G6PDH que imposibilita su medida. Ya que la vida media de la G6PDH es de menos de dos horas a 37°C, el principio de medida no está indicado para determinar citotoxicidad en largos periodos de tiempo.

Promega Corporation (Madison, Wi) comercializa kits para viabilidad celular, citotoxicidad y proliferación celular bajo los nombres de «CellTiter 96», «Celltiter-Glo», «CytoTox 96» y «CellTiter-Blue». «CytoTox 96» es un ensayo colorimétrico para determinar la citotoxicidad de un compuesto. Este ensayo mide cuantitativamente la liberación de LDH de células muertas usando la reducción enzimática de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolio (INT) y un marcador tipo MTS tetrazolio (US Pat. N° 5,185,450). Este ensayo consiste en un proceso (no homogéneo) en dos etapas en el que el NADH formado por la acción de la enzima LDH se oxida con el marcador INT que al reducirse se detecta colorimétricamente.

10 La compañía Promokine comercializa una serie de kits colorimétricos para la determinación de la viabilidad celular basados en sales de tetrazolio solubles en agua (WST): «I», basado en WST-8; «II», basado en WST-1; «III», basado en XTT; «LDH cytotoxicity kit». Adicionalmente, dispone de otro kit, «Akkitotoxicity kit», basado en la enzima adenilatokinasa.

15 Genotech (St. Luis, Mo.) comercializa el kit «CytoScan», un método colorimétrico que mide la LDH liberada por las células muertas. La enzima liberada se mide vía reacción enzimática acoplada que resulta en la reducción de una sal de tetrazolio a un formazán rojo. La actividad de LDH se determina como una función de la oxidación de NADH o la reducción del tetrazolio en un periodo de tiempo (ver catálogo n° 786-210). Roche
20 Molecular Biochemicals comercializa el producto «Citotoxicity Detection Kit», con una metodología similar al kit «CytoScan».

Clontech comercializa el kit «LDH Cytotoxicity Detection kit». Abcam hace lo propio con «LDH-Cytotoxicity Assay Kit II». Ambos kits están basados también en sales de tetrazolio.

5 Sigma-Aldrich (St. Luis, Mo) comercializa dos kits diferentes para la determinación de toxicidad *in vitro* bajo los nombres de «Tox7» y «Tox8». «Tox7» se basa en la enzima LDH y es esencialmente idéntico al «CytoScan» de Genotech. «Tox7» es un proceso en dos etapas que requiere transferir el sobrenadante o un lisado celular a otro recipiente donde es analizado. El marcador de tetrazolin específico en «Tox7» no es indicado, pero la bibliografía del mismo indica que la reacción es medida espectrofotométricamente a la
10 longitud de onda de 490 nm, donde se detecta el máximo de absorción típico de los formazanes. En «Tox8» las células viables reducen el resazurin a resorufin. La cantidad de marcador reducido puede ser medido fluorométrica o espectrofotométricamente.

BioSource (Life Technologies, Corp.) comercializa kits para medir proliferación y viabilidad celular bajo el nombre «Alamar Blue» (DAL1025 y DAL1100). Al igual que el
15 resazurin, «Alamar Blue» se puede usar para monitorizar el ambiente reductor de las células vivas. Los detalles técnicos de este kit se describen en la patente USA N° 5,501,959.

Roche Farma (S.A.) comercializa los productos «Cytotoxicity Detection Kit (LDH)» y el «Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH)». Los dos están basados en la misma reacción del kit «Cytotox 76» de Promega.

20 La mayoría de estos kits requieren de un procedimiento en dos etapas para separar el medio de cultivo y, por tanto, son no homogéneos. Los procesos no homogéneos no son recomendables para programas intensivos de «screening» debido a la gran cantidad de

manejo de muestras que necesitan. Quedaría por desarrollar un test citotóxico que mida la muerte celular, más que la viabilidad, que sea rápido, que los componentes no sean tóxicos (se podría utilizar con células vivas) y que los componentes citoplasmáticos tengan una vida media superior a dos horas para poder realizar ensayos de citotoxicidad de larga
5 duración. En este sentido, Terry y col. (2006, US Pat. 6,982,152 B2) han desarrollado un kit en el que se añade la sustancia cuya toxicidad quiere determinarse a una muestra de cultivo celular y, tras el periodo de incubación, se añaden los componentes del kit. Este incluye un sustrato (lactato) para la enzima citoplasmática (LDH), un marcador (resazurin o MTS), un agente transferente de electrones (la enzima diaforasa) y un reactivo oxidado
10 (NAD^+). Con este kit se puede determinar la liberación de la enzima LDH por las células muertas. Las reacciones que ocurren son las siguientes: la enzima LDH transforma el lactato a piruvato reduciendo el NAD^+ a NADH. El NADH se transforma a NAD^+ con la ayuda de la enzima diaforasa y el marcador resazurin se reduce a resorufin, cuya concentración es determinada colorimétrica o fluorimétricamente (560/590 nm).

15 Sin embargo, el método anterior requiere el uso de otra enzima secundaria que transforme un sustrato secundario en una forma que se pueda diferenciar de la original mediante alguna técnica espectrofotométrica. Este procedimiento, obviamente, es más costoso y no es muy diferente a los anteriormente descritos en cuanto a los principios de detección.

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida al desarrollo de un método y creación de un kit para la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). El método y el kit creado permitirán la determinación de la concentración de la enzima LDH en disolución acuosa y

5 la determinación *in vitro* del efecto citotóxico y/o viabilidad celular a través de la cuantificación de LDH liberada al medio tras la pérdida de la integridad de la membrana celular producida por la exposición de células a tóxicos o perturbaciones físicas (ej. condiciones de cultivo).

Cuando se emplea para determinar muerte celular, el método comprende la

10 incubación de las células, en medio de cultivo, con el/los tóxicos objeto de estudio o la aplicación de perturbaciones físicas. Éstos causarán la rotura total o parcial de la población celular y, consecuentemente, se producirá la liberación de material citoplasmático, como la enzima LDH, al medio.

La mezcla de reactivos utilizada en el método no es tóxica para las células vivas,

15 por lo que en ensayos de pequeño volumen se puede adicionar *in situ* a las células incubadas sin afectar los resultados del estudio. En ensayos de mayor volumen se recomienda adicionarla a muestras extraídas del recipiente donde se realiza el estudio. Cuando las células objeto de estudio presenten autofluorescencia (ej. Microorganismos fotosintéticos) o la muestra contenga muchos restos celulares el sobrenadante habrá de

20 clarificarse. El método también podrá aplicarse al sobrenadante libre de células.

La mezcla de reactivos está compuesta por lactato (sustrato de la enzima LDH) y el cofactor NAD^+ , y podrá contener un tampón si el medio no está tamponado.

Como se muestra en la Fig. 1, cuando el lactato se usa como sustrato y la enzima LDH es el componente celular a medir, la enzima liberada por las células muertas o no viables inicia la reacción de la Fig. 1. En la reacción, el lactato incluido en la mezcla de reactivos del método es oxidado a piruvato. Esta reacción requiere NAD^+ .

5 La oxidación de lactato a piruvato resulta en la producción de NADH. El resultado final es un método en el que un componente citoplasmático, la enzima LDH, liberada por las células muertas o no viables es cuantificada indirectamente a través de la generación de NADH. La producción del NADH es proporcional a la cantidad de enzima LDH presente. Por tanto, se deberá obtener experimentalmente una curva patrón que relacione la cantidad
10 de NADH producido con la cantidad de enzima LDH presente en un volumen determinado de muestra. La muestra debe proceder del lisado completo de un número conocido de células.

La producción de NADH es medida fluorimétricamente excitando a 353 nm y midiendo la máxima emisión de fluorescencia a 450 nm. Este método de medida está
15 especialmente indicado, ya que la determinación fluorimétrica es una técnica muy sensible (nivel de detección de hasta 0,001 U de LDH).

Existen dos alternativas en cuanto al procedimiento de uso: bien las células se incuban un cierto tiempo en presencia del tóxico o perturbación física objeto de estudio y después de dicho periodo se añade la mezcla de reactivos a las células; bien las células se
20 incuban un cierto tiempo en presencia del tóxico o perturbación física objeto de estudio y la mezcla de reactivos. Esta última opción es la aconsejada para seguir en el tiempo el efecto sobre la supervivencia celular.

El medio en que las células son cultivadas no limita la funcionalidad de la invención, aunque cualquier medio no reductor es preferible para minimizar cualquier reducción no específica del NAD^+ . Se ha comprobado la validez del método en medios de cultivo para procariotas, células animales y microalgas.

5 En una aplicación del método, el tóxico a estudiar será una o varias sustancias putativamente inhibidoras del crecimiento, sin prácticamente limitación alguna en cuanto a su naturaleza. El tóxico podrá ser, por ejemplo, cualquier elemento, compuesto, mezcla, droga, fármaco, etc.; pudiendo encontrarse en cualquier forma (sólido, líquido o gas).

En otra aplicación, el agente causante de la inhibición o muerte, cuyos efectos sobre
10 la viabilidad celular quieran ser determinados, será cualquier perturbación física, incluyendo condiciones ambientales (o combinación de ellas), como temperatura, humedad, luz, nivel de oxígeno, pH, nivel de agitación, osmolaridad, etc. El método de la invención también puede ser usado en el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos y drogas citotóxicas para ser usadas como fármacos contra cánceres o infecciones específicos.

15 Las células a usar en el método pueden ser obtenidas de cualquier fuente, y pueden ser eucariotas o procariotas. Por ejemplo, las células humanas pueden ser recogidas por los médicos en las consultas o en los hospitales y ser enviadas a los laboratorios centrales para su estudio utilizando el método de la presente invención.

La naturaleza y la procedencia de las células a estudiar no son críticas para la
20 aplicación de la invención.

Si se parte de colonias celulares en placas se deberá preparar una suspensión celular o un subcultivo de suficiente tamaño para la aplicación del método. El procesado de dicha suspensión dependerá de los aparatos y métodos utilizados en los estudios de susceptibilidad.

- 5 Un resultado importante del ensayo con bacterias es la generación de información del posible éxito del tratamiento de una población con un determinado antibiótico. O también, la determinación de contaminación en muestras o superficies supuestamente libres de ellas. El ensayo de citotoxicidad puede ser la susceptibilidad de las células tumorales ante cualquier fármaco o la influencia de un fármaco sobre otros tejidos o células sanas.
- 10 Los ensayos de sensibilidad celular permitirán determinar las condiciones de cultivo que puedan dañar a las células o las óptimas para una máxima supervivencia celular en cualquier proceso biotecnológico.

- 15 El método descrito es inherentemente cuantitativo en el sentido de que la cantidad de NADH es proporcional a la concentración de LDH y, por tanto, al número de células lisadas. El método, sin embargo, puede ser usado tanto cualitativa como cuantitativamente. El uso cualitativo se hará en aparatos y métodos que producen resultados que, generalmente, indican si un organismo o espécimen celular es sensible o resistente a unas condiciones de cultivo o compuesto. El grado relativo de sensibilidad o resistencia no se suele informar en ensayos cualitativos. El término cuantitativo se refiere a equipos de
- 20 ensayo y métodos que proporcionan datos de concentración de sustancia o datos exactos de variables de cultivo que inhiben el crecimiento celular.

El protocolo general del método sería el siguiente:

Primero, todos los componentes de la mezcla de reactivos (NAD⁺, lactato) son disueltos en un disolvente acuoso, que podrá estar tamponado, y se deja equilibrar a temperatura ambiente. Así se obtienen todos los componentes necesarios para llevar a cabo el método.

- 5 La mezcla de reactivos se añade a las muestras a medir, habiendo sido estas incubadas previamente un tiempo predeterminado en presencia de tóxicos o de perturbaciones físicas objeto de estudio. Las muestras son mezcladas suavemente para homogeneizar. Posteriormente, las muestras se incubarán durante un periodo de tiempo adecuado, usualmente alrededor de veinte minutos, para que la reacción se lleve a cabo.
- 10 Tras este periodo se realizarán las medidas de fluorescencia.

Para una mayor uniformidad en las medidas, la reacción se parará con un agente adecuado; por ejemplo, la adición de una disolución acuosa de dodecilsulfato sódico (SDS) hasta alcanzar un 6 % p/v de SDS en la muestra.

- 15 La fluorescencia del NADH será registrada. Dicho valor es indicativo de la cantidad de LDH presente en la muestra. Los valores recomendados para excitación y emisión son de 353 nm y de 450 nm, respectivamente. Se pueden permitir pequeñas variaciones sobre estos valores de longitudes de onda. Las medidas se pueden realizar en placas de pocillos siempre que el dispositivo de medida pueda realizar medidas de microfluorescencia.

- 20 La presente invención también propone la creación de kits que contengan los reactivos y las instrucciones necesarias para la aplicación de los métodos anteriormente descritos. En su forma preferente, el kit incluye una mezcla liofilizada que incluya el sustrato (lactato) y el cofactor (NAD⁺), en un primer recipiente. En un segundo recipiente

estará una cantidad determinada de enzima (LDH) para permitir la calibración del método. Un tercer recipiente opcional podrá contener la disolución de parada de la reacción. Un cuarto recipiente de uso opcional contendrá el tampón de carbonato/bicarbonato. Otro recipiente opcional adicional podrá contener una disolución de lisis celular. El kit deberá

5 incluir las instrucciones de uso y aplicación del método.

Es preferible que la mezcla de sustrato, cofactor y tampón estén presentes en forma sólida liofilizada para ser reconstituida para producir una disolución de reactivos que no sea tóxica para las células y que contenga los componentes necesarios para aplicar el método descrito. El formato liofilizado es el preferido porque es más sencillo de almacenar y

10 transportar. El kit, sin embargo, puede ser configurado de tal manera que los componentes listados anteriormente se sirvan como una mezcla de reactivos en disolución lista para ser usada.

Cuando la mezcla de reactivos es reconstituida como disolución, es aconsejable que esta contenga un disolvente, lactato y NAD^+ . Cuando la mezcla sea usada directamente en

15 cultivos celulares tamponados no será necesario el uso del tampón incluido, siempre que el medio tenga un pH entre 6,5 y 8,5. Para medios no tamponados, la mezcla contendrá el tampón carbonato/bicarbonato para un pH óptimo de 8,25, si este es compatible con la línea celular en estudio. En caso contrario, deberá hacerse un estudio previo de los valores de pH compatibles con la línea celular específica. Más específicamente, una vez reconstituida la

20 mezcla, las concentraciones deberían estar comprendidas en los siguientes rangos para cada componente: entre 10 mM y 80 mM de lactato sódico; entre 1mM y 4mM de NAD^+ ; entre 100 mM y 1mM de carbonato/bicarbonato sódico. Cuando se reconstituya la disolución de

LDH, esta deberá contener entre 0,1 y 1 U/mL. Estos componentes están presentes en cantidades necesarias para proporcionar una osmolaridad de aproximadamente 250 mOsm. No obstante, puede ser necesario y recomendable la optimización de la cinética para una línea celular y medio de cultivo específicos.

- 5 La disolución de parada del kit es, preferentemente, SDS, preparada en concentraciones entre 30% y 50% de SDS.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de la reacción del lactato con NAD^+ catalizada por la enzima LDH.

Figura 2. Relación entre la concentración de NADH en medio de cultivo L1 y la emisión de fluorescencia a 450 nm.

5 **Figura 3.** Efecto del pH en la actividad de la enzima LDH en la reacción descrita en la Figura 1. La actividad de LDH se establece de forma indirecta a través de la emisión de fluorescencia del NADH de la muestra a 450 nm, producido por la LDH. Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

10 **Figura 4.** Relación entre el número de células rotas y la emisión de fluorescencia del NADH producida por la enzima LDH según reacción de Fig.1. (A) Células de la microalga *Protoceratium reticulatum*. (B) Células de la microalga *Protoceratium reticulatum* CCMP3241. (C) Células de linfocito T de ratón. Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

15 **Figura 5.** Efecto de la concentración de SDS en la disolución de parada sobre la cinética de la reacción descrita en la Figura 1, seguida por medio del producto de reacción NADH cuya fluorescencia se midió a 450 nm. Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

Figura 6. Influencia de la concentración de Lactato y NAD^+ en la producción por parte de la LDH de NADH medida esta última como emisión de fluorescencia a 450 nm.

20 **Figura 7.** Influencia de la concentración de lactato y tiempo de reacción en la producción por parte de la LDH de NADH medida esta última como emisión de fluorescencia a 450 nm.

Figura 8. Influencia de la concentración de LDH en la producción de NADH medida como emisión de fluorescencia a 450 nm. Reacción llevada a cabo con dos combinaciones diferentes de concentración de lactato y NAD^+ . Tiempo de reacción de 30 min.

Figura 9. Estabilidad de LDH en disolución medida como la fracción entre la fluorescencia de NADH producida por LDH disuelta en medio de cultivo un tiempo determinado frente a la producida por LDH, recién adicionado al medio.

Figura 10. Producción de NADH por LDH según reacción de Fig.1 en medio de cultivo L1, con y sin agente de parada (SDS al 6%; concentración final en muestra). NADH fue medido como unidades de fluorescencia a 450 nm.

Figura 11. Aplicación de la invención para evaluar el efecto del estrés hidrodinámico, (medido como velocidad de disipación de energía), sobre la fracción relativa de células rotas o lisadas. Esta fracción fue calculada cuantificando la concentración de LDH según el método de la presente invención y refiriéndola a una curva patrón donde los valores de concentración de LDH por célula fueron obtenidos previamente lisando un número conocido de células.

ENSAYOS DE REALIZACIÓN

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan aquí sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Correlación entre medida de fluorescencia y concentración de NADH

Es ampliamente conocido que la NADH excitada a 340 ó 365 nm emite fluorescencia en el rango de 400 a 550 nm, con un máximo a 450 nm. Por el contrario, el NAD⁺ no fluoresce en estas condiciones. Para poder utilizar esta propiedad como medida de la extensión de la reacción descrita en la Figura 1, es necesario establecer la linealidad entre fluorescencia a 450 nm y concentración de NADH en disolución. La Figura 2 demuestra la existencia de esta relación lineal, tanto en disolución estrictamente acuosa, como en medios de cultivo.

15

Ejemplo 2. Determinación del pH óptimo para la enzima LDH

Toda enzima tiene su rango óptimo de acción fuera del cual se inactiva. Por ello es necesario conocer si las condiciones de pH de los cultivos pueden tener influencia en las medidas del presente método. Para ello, se determinó la acción de la LDH en el rango de pH de 6,5 a 8,5, que abarca las condiciones más usuales de cultivo de muchas líneas

20

celulares. Para fijar pH inferiores a 7,5 se utilizó búfer fosfato-bifostato y para pH superiores búfer carbonato-bicarbonato.

En la Figura 3 se muestra que hasta pH=8 la LDH presenta actividad pero es a pH=8,25 cuando es máxima y cuatro veces mayor que a valores de pH inferiores. Es por ello que el búfer que se incluye en el método de la presente invención es el de carbonato-bicarbonato. Aunque las medidas se pueden realizar a cualquier pH, es recomendable usar cualquier medio tamponado cuyo pH no sea inferior a 6,5 ni superior a 9.

Ejemplo 3. Demostración de la fluorescencia de fondo y linealidad

La disolución de reactivos, descrita anteriormente, se preparó a partir de la mezcla liofilizada que ya contenía el tampón. Los siguientes tipos de células fueron utilizados para los ensayos: (a) las cepas GG1AM y CCMP3241 de la microalga *Protoceratium reticulatum* (división Dinophyta, Clase Dynophyceae) cultivadas en medio de cultivo L1 (Guillard y Hargraves, *Phycologia* **1993**, 32:234–6.); (b) células de la microalga *Karlodinium veneficum* (división Dinophyta, Clase Dynophyceae), cultivadas en medio de cultivo L1; (c) células de Linfocitos T de ratón, línea EL-4, cultivadas en medio de cultivo RPMI con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Se prepararon diluciones seriadas de cada uno de los cultivos celulares anteriormente citados, utilizando el propio medio de cultivo como agente diluyente. Las diluciones fueron preparadas en placas de pocillos, completando hasta un volumen de 100 μ L. El rango de concentración cubierto fue de 0 a 80000 células por pocillo. Seguidamente, se adicionó a cada pocillo 100 μ L de la disolución de reactivos, objeto de esta patente. Esta disolución contenía para este ensayo lactato a 1,5 mM y NAD^+

a 1,5 mM y tampón para ajustar el pH a 8,25. El volumen total en cada uno de los pocillos fue de 200 μ L. Todos los pocillos se incubaron durante 20 min; los que contenían microalgas lo hicieron a 17 °C y el resto a 37°C. Después de este periodo, las células se lisaron aplicando ultrasonidos (Ciclo 0,5, Amplitud 80% y 200 W) durante 1 minuto. A

5 continuación, los pocillos fueron centrifugados para precipitar fragmentos celulares. Finalmente, se midió la emisión de fluorescencia de cada pocillo con un lector de placas. Las longitudes de onda para la excitación y emisión fueron 353 nm y 450 nm, respectivamente. A título ilustrativo, en la Figura 4 se muestran algunos de los resultados obtenidos. En todos los casos hubo una relación lineal entre fluorescencia de las muestras

10 (por tanto, concentración de NADH producido por la LDH liberada) y número de células rotas. También se observó un nivel basal de fluorescencia (ensayo realizado en ausencia de células rotas) dependiente del medio de cultivo. El valor más elevado de este nivel basal correspondió a los ensayos con linfocitos T. Algunos componentes del suero fetal bovino, empleado en el medio de cultivo, podrían presentar fluorescencia a 450 nm.

15

Ejemplo 4. Congelación de la reacción

La congelación de la reacción descrita en la Figura 1 es un aspecto interesante tanto para el almacenamiento de muestras como para la medida de un gran número de estas en un corto intervalo de tiempo. La congelación de la reacción se llevó a cabo mediante la adición

20 de una disolución acuosa de dodecilsulfato sódico (SDS) (a partir de ahora disolución de parada). En placas de pocillos se adicionaron 90 μ L por pocillo de la mezcla de reactivos descrita anteriormente y a las concentraciones siguientes de los mismos: $[LDH]=2,5 \cdot 10^{-3}$

Un volumen de 50 μL de disolución de parada del 6% en SDS fue suficiente para congelar la reacción, descrita en la Figura 1, desarrollada en pocillos en los que se lisaron 40000 células de *P. reticulatum* en un volumen de 90 μL de mezcla conteniendo reactivos a las siguientes concentraciones: [Lactato]=40 mM; [NAD⁺]=3 mM (datos no mostrados).

Un estudio del efecto de las concentraciones de enzima LDH, lactato, NAD^+ y tiempo de reacción sobre la emisión de fluorescencia de la mezcla reaccionante ha permitido seleccionar un rango de operación para cada uno de estos factores. En este sentido, la concentración de lactato podría oscilar entre 0,075 y 80 mM; la concentración de NAD^+ entre 0,075 y 3 mM. La combinación de ambas concentraciones y el tiempo de reacción permiten cuantificar un amplio intervalo de concentraciones de LDH en muestras. Las Figuras 6, 7 y 8 ilustran algunos de los ensayos realizados. Como puede apreciarse, tanto la concentración de lactato como la de NAD^+ tienen importancia en la producción de NADH por la enzima LDH.

22

La enzima LDH se añadió a los diferentes medios de cultivo, sin células, a una concentración de $2,5 \cdot 10^{-3}$ U/mL. Las soluciones se mantuvieron a 37°C, para el medio RPMI+10% FBS y a 19°C, para el medio L1. A los tiempos indicados en la Fig. 9 se extrajeron muestras a las que se añadió mezcla de reactivos objeto de la invención (lactato, NAD⁺ y búfer) y se les midió la fluorescencia a 450 nm. Las condiciones de los ensayos fueron similares que las descritas en el Ejemplo 2. La Figura 9 muestra la actividad de LDH en los medios de cultivo L1 y RPMI+10%FBS. Se puede observar que la actividad de LDH depende del medio donde esté disuelta la enzima, reduciéndose un 50% en 24 horas en el caso del medio L1 y en un 25% en el caso del medio RPMI. Con lo que la vida media es lo suficientemente alta como para permitir ensayos de citotoxicidad o daño celular de larga duración.

Ejemplo 7. Efecto del tiempo de reacción en la fluorescencia de la NADH formada

En la Figura 10 se observa que después de 12 horas de reacción la concentración de NADH formado en la muestra, medida como fluorescencia a 450 nm, es estable al menos hasta 24 horas del inicio de la reacción. La congelación de la reacción con SDS a los 30 minutos también fue efectiva 24 horas después. Este ejemplo demuestra que la presente invención puede ser usada para medir lisis o rotura celular *in situ* para largos periodos de tiempo de incubación.

Ejemplo 8. Uso de la presente invención para medir el grado de lisis celular a través de la cuantificación de la enzima LDH en cultivos de células sometidos a estrés hidrodinámico

Uno de los fenómenos más comúnmente observado en el cultivo de células
5 sensibles a la turbulencia es la lisis o rotura celular por estrés hidrodinámico. Microalgas y células animales, como las utilizadas en los anteriores ejemplos de la presente invención, fueron sometidas a diferentes velocidades de disipación de energía (una medida del estrés hidrodinámico) en un dispositivo de contracción de flujo durante fracciones de segundo. Tras este tratamiento los cultivos se centrifugaron suavemente para separar el sobrenadante.
10 A una fracción del sobrenadante se añadió igual volumen de mezcla de reactivos (NAD⁺, lactato, tampón carbonato-bicarbonato) a cada pocillo (90 µL). Los pocillos se agitaron durante 30 segundos y se incubaron posteriormente durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió a cada pocillo la disolución de parada. Finalmente se midió la emisión de fluorescencia a 450 nm (excitación a 353 nm).
15 Previamente, concentraciones conocidas de células fueron lisadas completamente mediante ultrasonidos. En los sobrenadantes se cuantificó la LDH siguiendo el método objeto de la presente invención y pudo establecerse una correlación entre unidades de fluorescencia del NADH (450nm) y concentración de LDH. Como el número de células es conocido pudo obtenerse la relación entre fluorescencia del NADH producido y número de
20 células rotas. Como se observa, el método de medida descrito en esta invención es capaz de cuantificar la fracción de células rotas debido al estrés hidrodinámico. La extensión del daño es dependiente de la especie. En la Figura 11 se muestran algunos de los resultados de

este ejemplo. Según la Figura 11, las células de linfocito T EL-4 mostraron una mayor sensibilidad al estrés hidrodinámico que las de insecto (SE-UCR).

Los ejemplos anteriores demuestran que el método de la invención se puede utilizar para determinar lisis celular, mediante la cuantificación de LDH medida como NADH
5 producido.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la cuantificación de la enzima LDH en disolución acuosa. El método comprende las siguientes etapas:
 - a) Preparación de la disolución conteniendo la enzima LDH,
 - 5 b) la adición a la disolución de la etapa a) de una mezcla de reactivos que contiene:
un disolvente, un sustrato y un cofactor para la enzima LDH. Posteriormente,
 - c) precipitación de las partículas que pueda haber en suspensión y
 - d) medida de la disolución de la etapa b) para la producción de la forma reducida del cofactor causada por la acción de la enzima sobre el sustrato contenidos en la
10 mezcla de reactivos añadida en la etapa b).
2. El método de la reivindicación 1, en el que se añade una etapa de parada de la reacción mediante la adición de un reactivo después de la etapa c).
3. El método, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la forma reducida del cofactor puede ser diferenciada de la forma oxidada fluorimétricamente.
- 15 4. El método, según las reivindicaciones 1, 2 y 3, en el que en la etapa b) de la reivindicación 1, el disolvente es una solución acuosa, el sustrato es lactato, el cofactor es NAD^+ y en la etapa c) de la reivindicación 1, la producción de la forma reducida del cofactor es NADH producida por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y cuantificada por espectrofotometría de fluorescencia.

5. El método, según las reivindicaciones 1 a 4, donde en la etapa b) de la reivindicación 1, el disolvente es una disolución tamponada de pH entre 8 y 9.

6. El método, según las reivindicaciones 1 a 5, en el que la mezcla de reactivos de la etapa b) de la reivindicación 1 se emplean las siguientes concentraciones de lactato y NAD⁺:

5 desde 1,5 mM a 250 mM de lactato

 desde 1,5 mM a 10 mM de NAD⁺

7. El método, según las reivindicaciones 1 a 6, en los que el disolvente de la etapa b) de la reivindicación 1 es una solución tampón de carbonato/bicarbonato con las siguientes concentraciones:

10 Desde 0,1 M a 0,1mM

8. El método, según las reivindicaciones 2 a 7, donde si la hubiere la solución de parada es un jabón o detergente.

9. El método, según las reivindicaciones 2 a 7, donde si la hubiere la solución de parada es dodecil sulfato sódico (SDS).

15 10. La aplicación de los métodos descritos en las reivindicaciones de 1 a 9 para la determinación de la rotura y/o muerte celular en cultivos de células procariotas o eucariotas, causada por un tóxico (por ejemplo, antibióticos, fármacos, aditivos del medio de cultivo, etc), condición ambiental (por ejemplo, pH, osmolaridad, etc) o por una perturbación física (por ejemplo, temperatura, irradiancia, nivel de agitación, etc). La
20 determinación se realizará cuantificando la concentración de LDH (liberada al medio tras la rotura y/o muerte celular) de acuerdo a una curva patrón realizada midiendo, mediante

espectrofotometría, la fluorescencia del NADH producido por la enzima LDH en volúmenes con concentración conocida de células que son lisadas previamente.

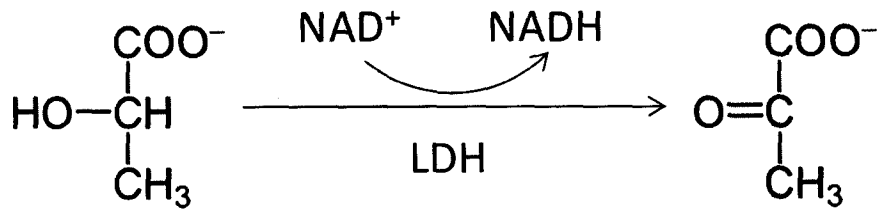


Figura 1.

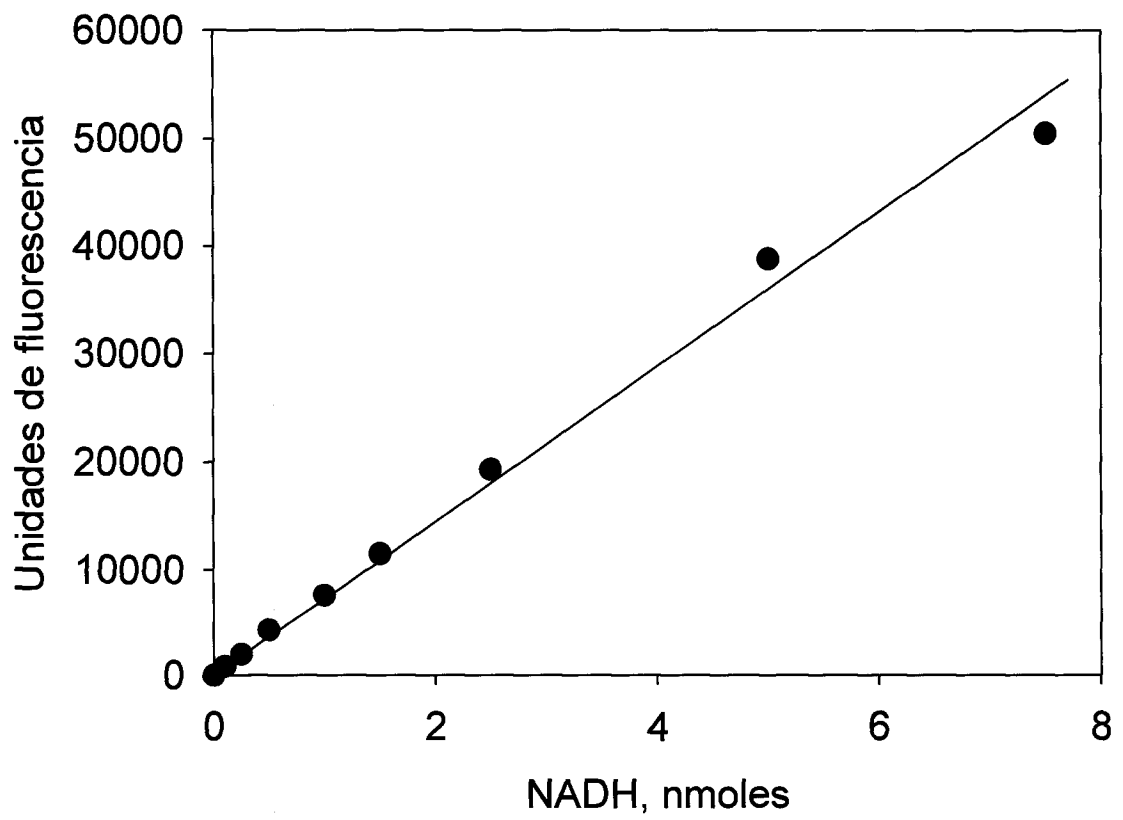
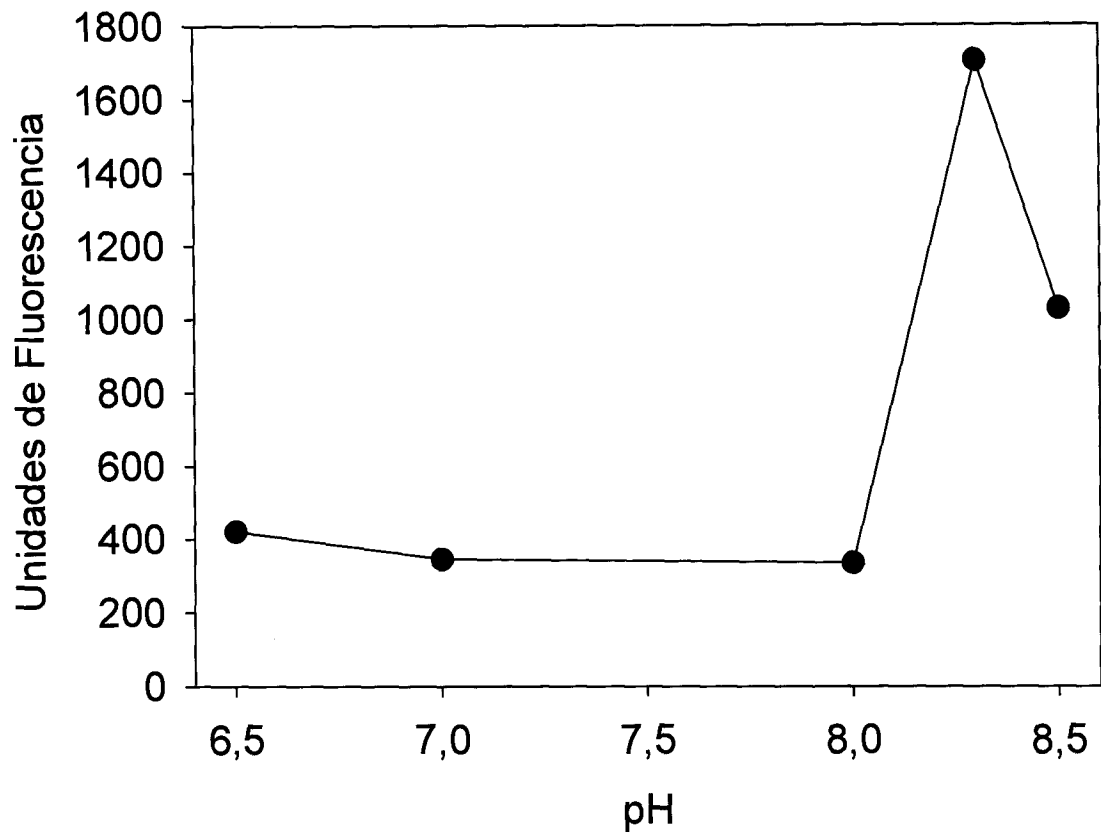


Figura 2.

**Figura 3.**

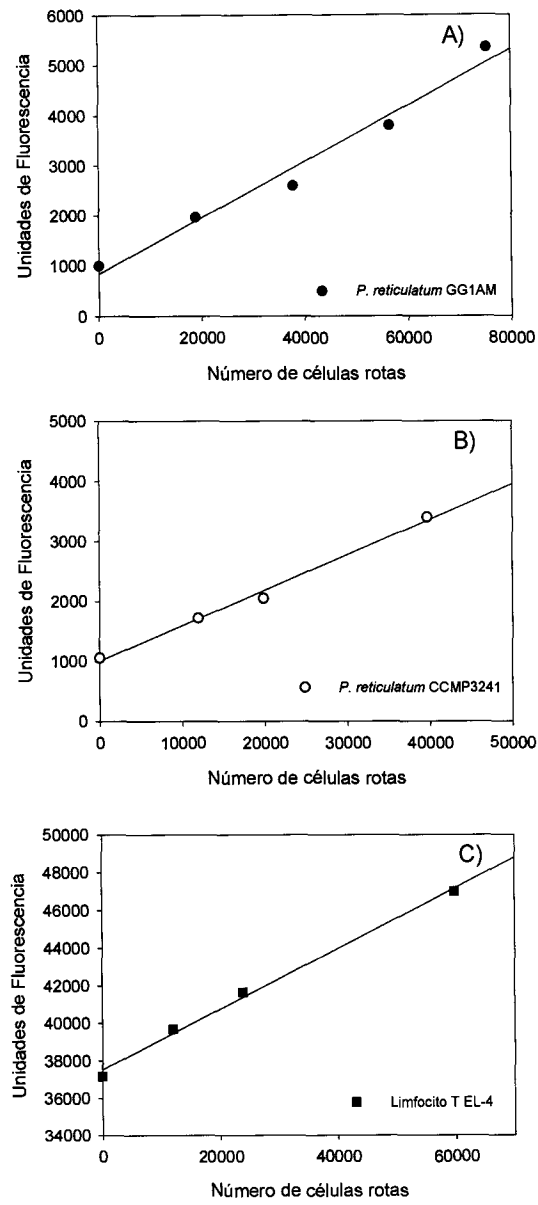


Figura 4.

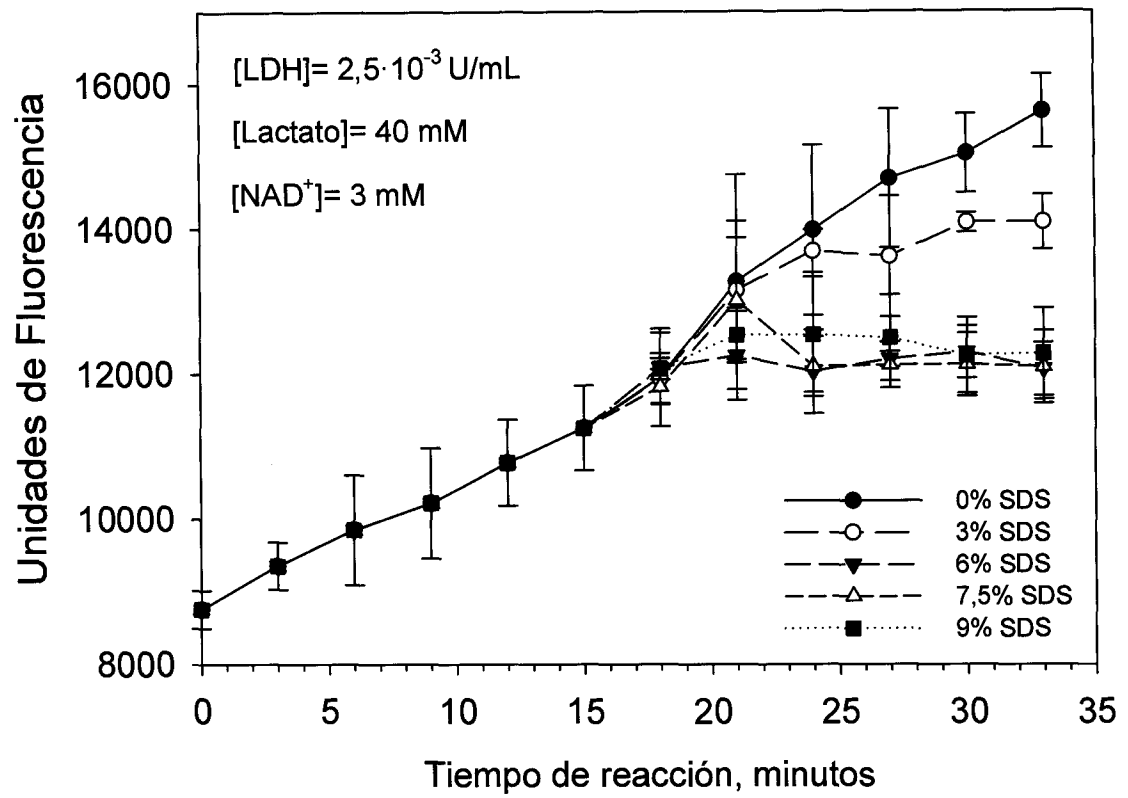


Figura 5.

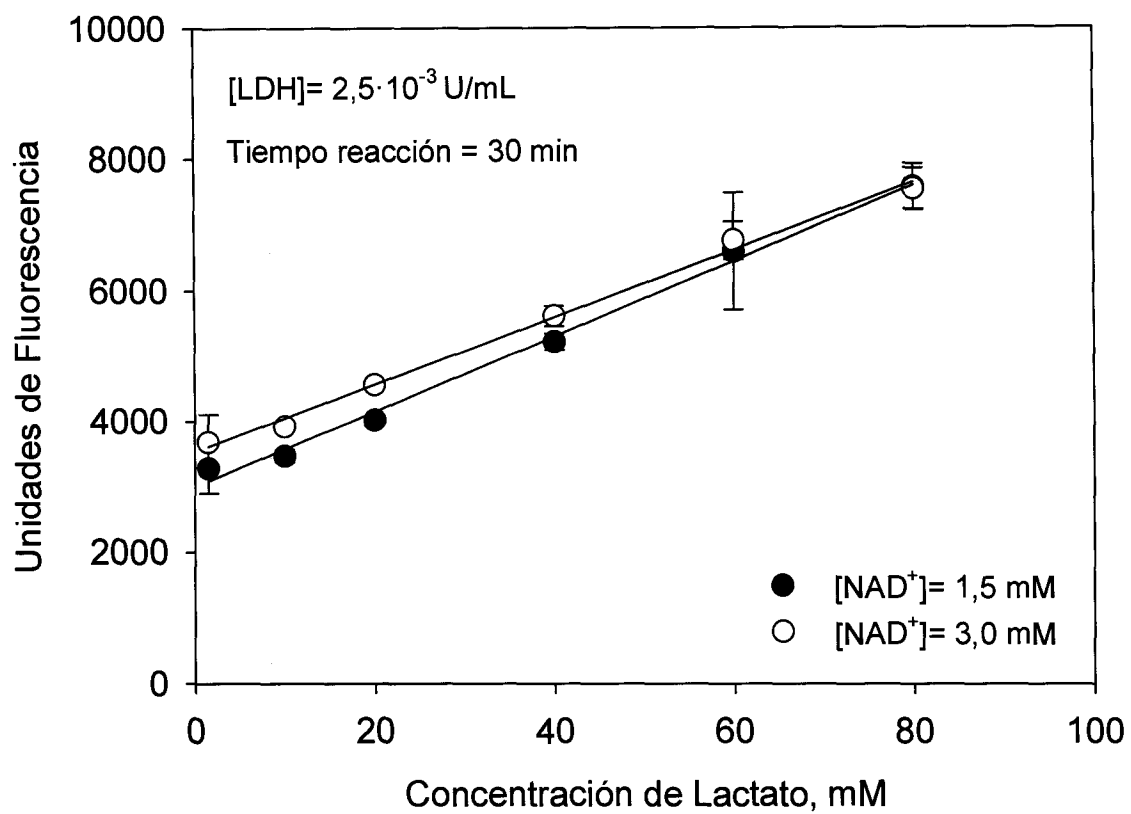


Figura 6.

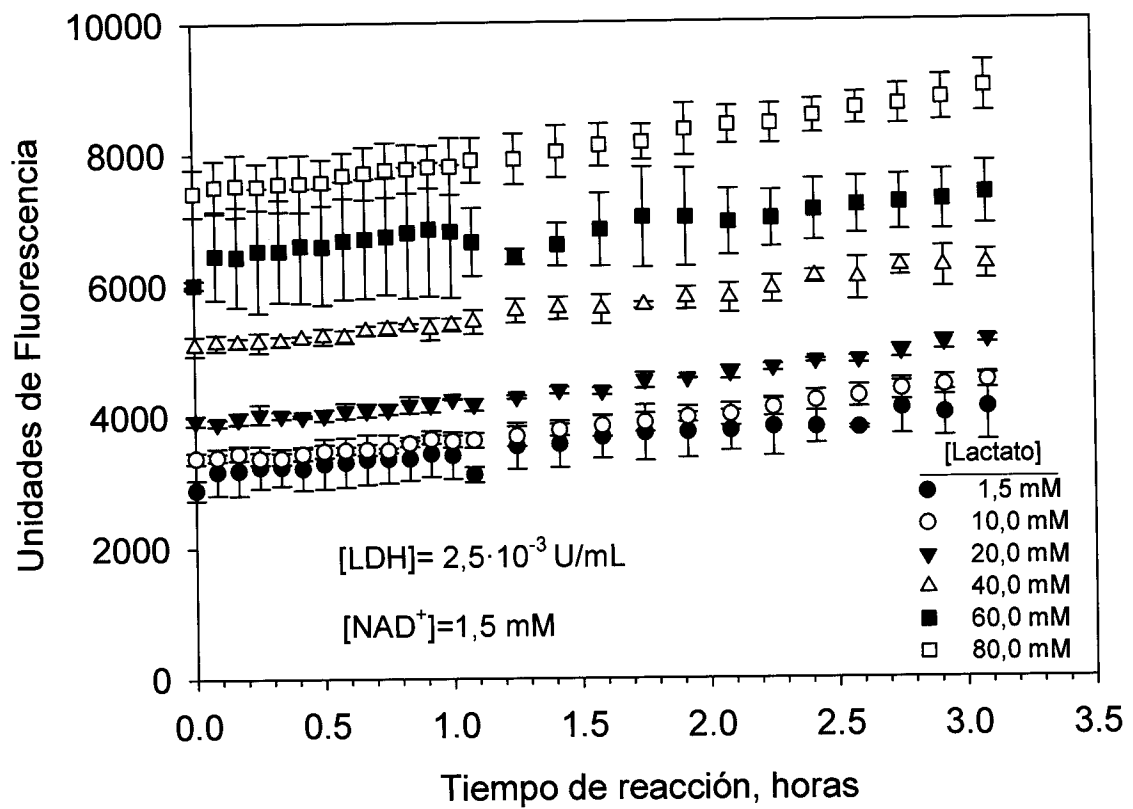
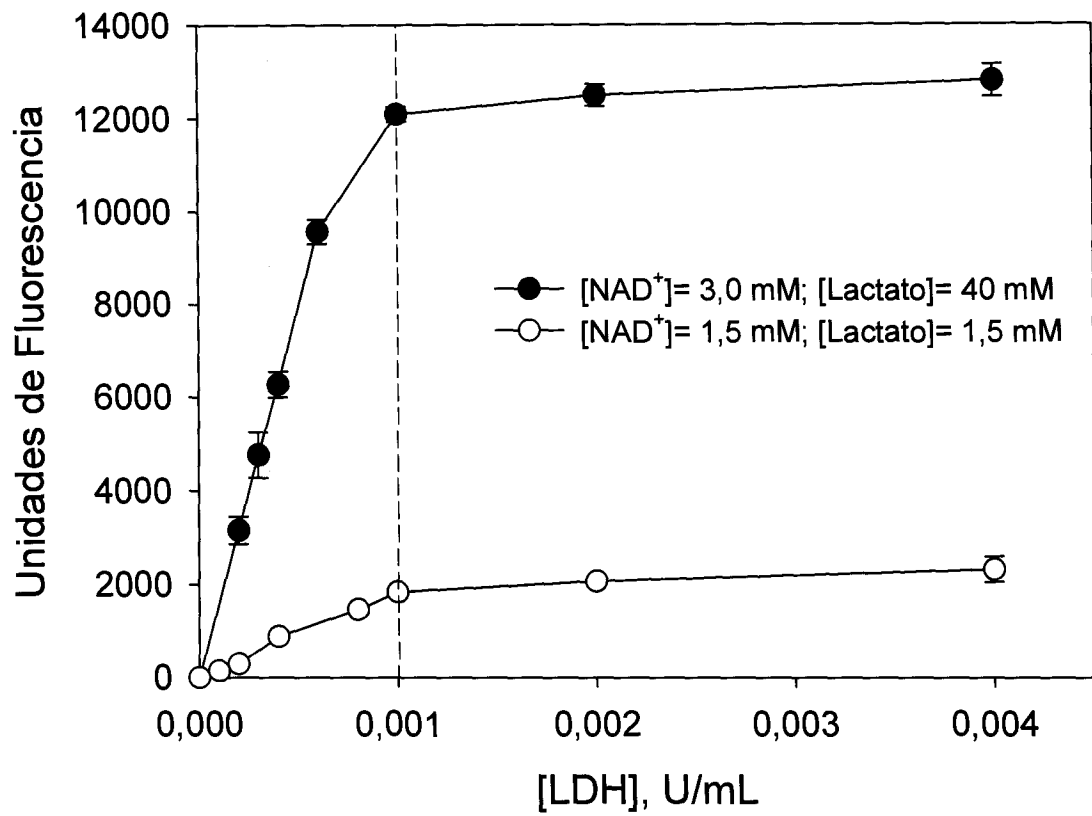


Figura 7.

**Figura 8.**

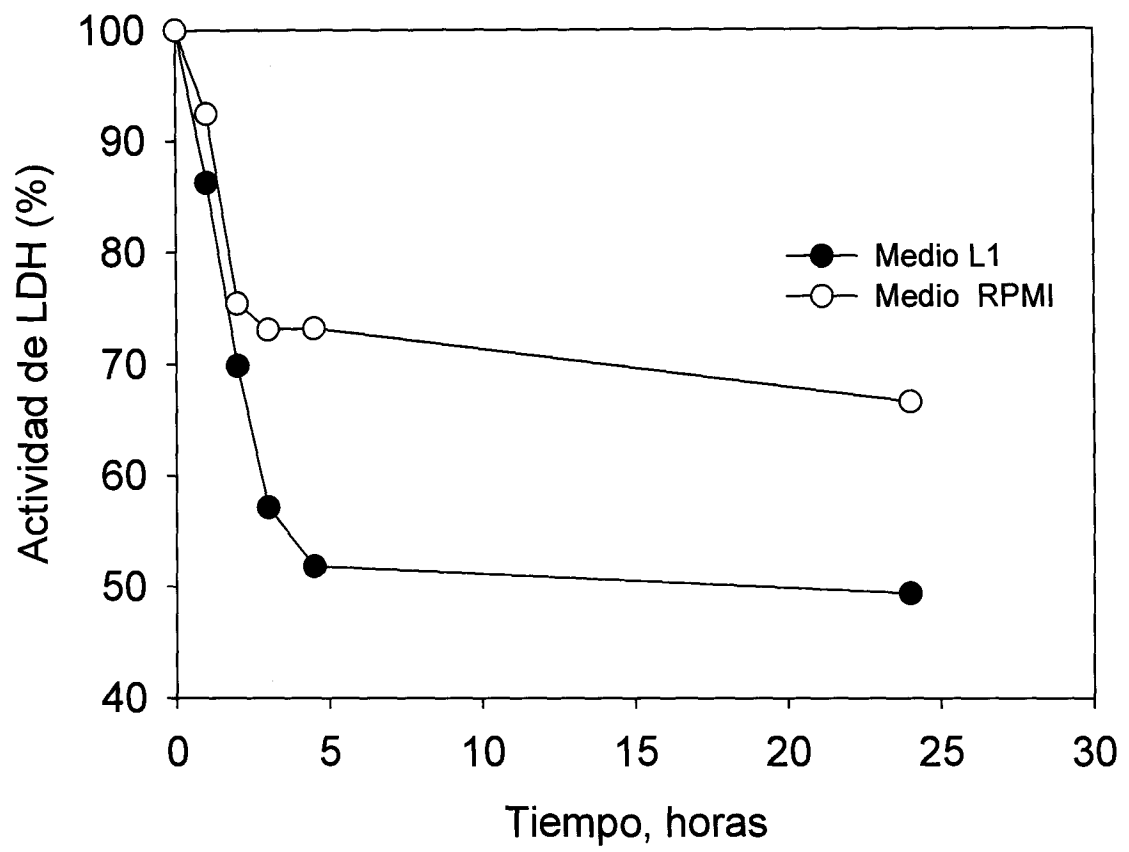


Figura 9.

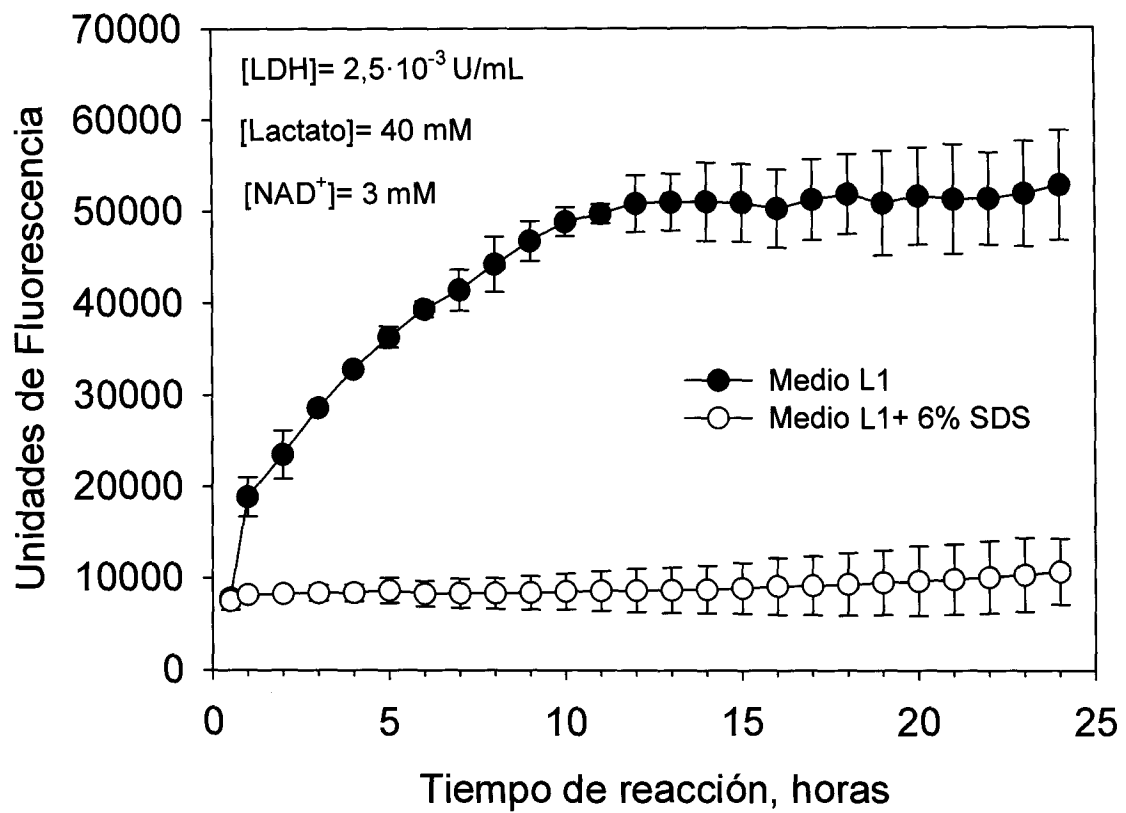


Figura 10.

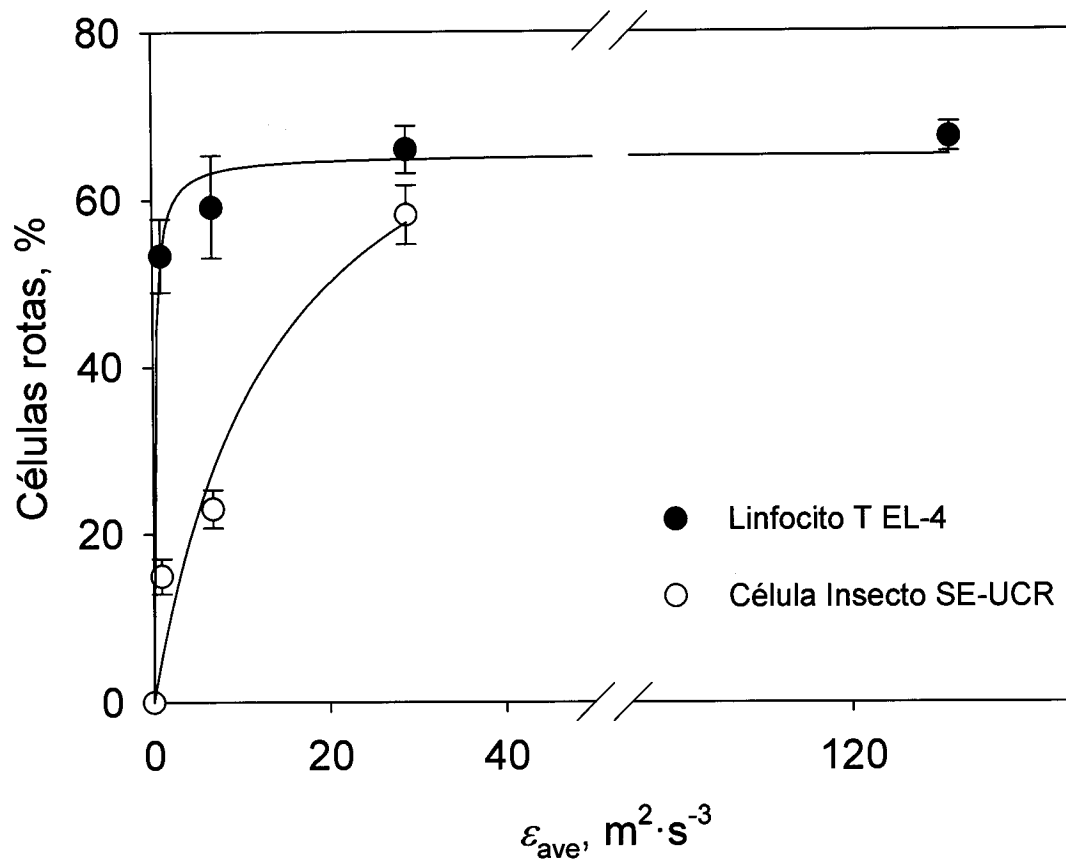


Figura 11.



- (21) N.º solicitud: 201300775
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 29.07.2013
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) Int. Cl.: **C12Q1/32** (2006.01)
G01N33/50 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 2249158 A1 (COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES) 10.11.2010, párrafos [0005],[0006]; reivindicaciones.	1-7,10
X	WO 03089635 A1 (PROMEGA CORPORATION) 30.10.2003, todo el documento.	1-4,8-10
X	RAMAN, R.N. et al. "Quantification of in vivo autofluorescence dynamics during renal ischemia and reperfusion under 355 nm excitation". OPTICS EXPRESS. 31.03.2008, Vol. 16, Nº 7, páginas 4930-4944, todo el documento.	1-7,10

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 nº:

Fecha de realización del informe
30.12.2014

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.12.2014

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-10

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-10

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en un método para cuantificar la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), cuantificando previamente por espectrofotometría de fluorescencia, la cantidad de NADH producida en la reacción de oxidación de lactato a piruvato, utilizando NAD^+ como cofactor.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 2249158 A1 (COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES)	10.11.2010
D02	WO 03089635 A1 (PROMEGA CORPORATION)	30.10.2003
D03	RAMAN, R.N. et al. "Quantification of in vivo autofluorescence dynamics during renal ischemia and reperfusion under 355 nm excitation". OPTICS EXPRESS. 31.03.2008, Vol. 16, Nº 7, páginas 4930-4944.	

El documento D01, describe un método de cuantificación de enzimas plasmáticas dependientes de NADH. Entre las enzimas cuantificadas, se encuentra la LDH y se hace de forma indirecta, cuantificando la cantidad de NADH por espectrofotometría de fluorescencia.

El documento D02, describe un método para cuantificar LDH en el que se utiliza el detergente SDS como solución de parada. Se menciona que puede cuantificarse directamente la cantidad de NADH, utilizando técnicas espectrofotométricas.

El documento D03, describe un método para valorar el daño renal producido después de isquemia renal y reperusión, midiendo la cantidad de fluorescencia asociada al aumento de NADH.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA****Reivindicaciones 1-10**

Los procedimientos para cuantificar LDH, utilizando la emisión de fluorescencia de NADH, están ampliamente descritos en el estado de la técnica. Los documentos D01-D03, son ejemplos en los cuales se cuantifica la cantidad de NADH utilizando su espectro de fluorescencia. La obtención de la concentración de LDH a partir de la concentración de NADH, resulta obvia para un experto en la materia. Las reivindicaciones 1-10, no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.