

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 860 353**

21 Número de solicitud: 202030265

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

01.04.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.10.2021

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE MURCIA (100.0%)
Campus Universitario de Espinardo. Edificio de
Servicios Integrados (Facultad de Medicina), 3º
planta
30100 Espinardo (Murcia) ES

72 Inventor/es:

CERÓN MADRIGAL, José Joaquín;
MARTÍNEZ SUBIELA, Silvia y
LÓPEZ ARJONA, Marina

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **ANTICUERPO MONOCLONAL Y POLICLONAL Y PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR OXITOCINA BASADO EN LOS MISMOS**

57 Resumen:

Anticuerpo monoclonal y policlonal y procedimiento para cuantificar oxitocina basado en los mismos.

La presente invención se refiere a un procedimiento in vitro para la cuantificación de oxitocina libre y oxitocina unida a proteínas en una muestra, en el que dicho procedimiento comprende llevar a cabo un primer ensayo que utiliza un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la oxitocina libre, y llevar a cabo un segundo ensayo que utiliza un anticuerpo policlonal que se une específicamente a la oxitocina unida a proteínas. La presente invención también se refiere a dicho anticuerpo monoclonal y policlonal y a la composición y kit que los comprenden.

ES 2 860 353 A1

DESCRIPCIÓN

ANTICUERPO MONOCLONAL Y POLICLONAL Y PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR OXITOCINA BASADO EN LOS MISMOS

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se refiere a ensayos inmunológicos para la detección de hormonas en material biológico. En particular, la presente invención se refiere a ensayos inmunológicos en los que intervienen anticuerpos monoclonales y/o policlonales y en los que se detecta oxitocina en material biológico.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La oxitocina es una hormona que se produce en los núcleos supraópticos y paraventriculares del hipotálamo y se libera en el sistema circulatorio. La oxitocina es una hormona asociada a la regulación de eventos de la fisiología reproductiva, tales como el parto y la lactancia, pero en los últimos años se le está dando una especial importancia a su relación con otros campos diferentes como son la psicología y el comportamiento tanto en hembras como en machos. La oxitocina induce una disminución en los niveles de cortisol, lo que reduce el estrés tanto en humanos como en animales. En general, los niveles de oxitocina se miden en animales y en humanos para detectar aumentos de su concentración en plasma indicativos de una situación de bienestar y reducción de estrés. Resulta importante medir los niveles de oxitocina para detectar estados de estrés, que son perjudiciales para la salud. Los estados de estrés provocan, entre otros efectos, una reducción en la función del sistema inmune y predisposición a enfermedades. Este deterioro de la salud y del bienestar animal, es importante cuando se trata de animales de cría o de granja, de los que se va a aprovechar su carne o productos derivados de los mismos, como la leche. La salud y el bienestar animal de estas cabañas ganaderas, en particular de las cabañas porcinas, adquieren especial relevancia durante los embarazos de las hembras y tras el parto, afectando, por ejemplo, al cuidado y supervivencia de las propias proles.

30 Generalmente, la concentración de oxitocina se ha medido mediante procedimientos que incluyen una extracción o una concentración de la muestra por liofilización. Los valores de oxitocina en las muestras biológicas son, generalmente, muy bajos. Tanto la extracción como la concentración de la muestra tienen como objetivo conseguir valores suficientemente altos de oxitocina para que puedan ser medidos.

Los métodos descritos en el estado de la técnica no permiten medir toda la oxitocina unida a proteínas y por ello resulta necesario en dichos métodos romper las uniones entre la oxitocina y las proteínas. Se emplean para ello, generalmente, tratamientos de reducción/alquilación (R/A).

5

La aplicación de tratamientos de R/A a muestras de plasma da lugar a valores de oxitocina varios órdenes superiores en comparación con los valores en muestras a las no se han aplicado dichos tratamientos (Brandtzaeg et al., 2016).

10 Los procedimientos de extracción, concentración de la muestra por liofilización y tratamientos de reducción/alquilación son técnicamente complejos y necesitan varias horas para su realización, no siendo utilizados de forma rutinaria en los análisis realizados en animales de granja debido al largo tiempo que necesitan. Además, en dichos procesos se utilizan reactivos y material de laboratorio costosos, lo que conlleva unos precios elevados
15 de los análisis.

MacLean et al. midieron oxitocina en saliva de perros por distintas técnicas, como cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) y ensayos comerciales de Cayman Chemical y Arbor Assays de inmunoabsorción ligada a
20 enzimas (ELISA), que no utilizan tratamientos de reducción y alquilación (MacLean et al., 2018). Este documento, sin embargo, no describe ningún ensayo en el que se pueda cuantificar específicamente oxitocina libre y oxitocina unida a proteínas, ni describe la utilización de anticuerpos con dicha especificidad frente a oxitocina libre y oxitocina unida a
25 proteínas.

25

Recientemente, se describió un procedimiento para medir oxitocina en muestras de saliva de cerdas, en distintos momentos después del parto, en el que se midió la concentración de oxitocina, con un ensayo AlphaLISA® utilizando esferas recubiertas de anticuerpos monoclonales (López-Arjona et al., 2020). Este documento no describe ningún ensayo en el
30 que se pueda cuantificar específicamente oxitocina libre y oxitocina unida a proteínas. Tampoco describe la utilización de anticuerpos con especificidad frente a oxitocina libre y oxitocina unida a proteínas.

Existe la necesidad en el estado de la técnica de desarrollar un procedimiento que permita
35 medir tanto la oxitocina libre como la oxitocina unida a proteínas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente memoria, la oxitocina es de mamíferos. Preferentemente, dichos mamíferos están seleccionados del grupo que consiste en cerdos, perros, equinos (comprendiendo
5 caballo, mulas y burros) y humanos. Más preferentemente, la oxitocina consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.

En la presente memoria, el término “muestra” se refiere a una muestra de un fluido corporal; a una muestra de células; a una muestra de un tejido, o de un órgano; o a una muestra de
10 fluido de lavado/enjuague obtenida de una superficie corporal externa o interna. Las muestras pueden obtenerse mediante técnicas bien conocidas. Más preferentemente, las muestras son muestras de fluidos corporales, por ejemplo, preferiblemente, sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido lagrimal y fluidos obtenibles de las glándulas mamarias, por ejemplo, la leche. Más preferentemente, las muestras de fluidos corporales están libres de
15 células del animal o sujeto. Las muestras de tejidos u órganos pueden obtenerse de cualquier tejido u órgano mediante, por ejemplo, una biopsia. Se pueden obtener o separar células de los fluidos corporales o de los tejidos u órganos mediante técnicas tales como la filtración, la centrifugación o la clasificación celular. Preferentemente, las muestras de células, tejidos u órganos se obtienen de los fluidos corporales, células, tejidos u órganos
20 que se sabe o se sospecha que contienen oxitocina. Más preferentemente, las muestras son muestras de suero, plasma, saliva, orina y líquido cefalorraquídeo.

La saliva presenta ventajas en comparación con otros tipos de muestra, ya que puede obtenerse de manera simple, sin producir estrés o dolor. Por esta razón, las muestras de
25 saliva se utilizan cada vez más para la determinación de biomarcadores de estrés o bienestar en animales, preferentemente en los cerdos.

En la presente patente, “oxitocina libre” se refiere a oxitocina capaz de liberarse tras un tratamiento de reducción-alquilación, o que ya se encuentre en forma libre previamente a
30 dicho tratamiento.

Un anticuerpo de ejemplo se compone de dos pares de cadenas polipeptídicas. Cada par de cadenas polipeptídicas tiene una cadena ligera (aproximadamente 25 kD) y una cadena pesada (aproximadamente 50-70 kD). El dominio N-terminal de cada cadena define una
35 región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables del reconocimiento de antígeno. El dominio variable de la cadena ligera también se denomina

“cadena ligera variable” o “VL” y el dominio variable de la cadena pesada también se denomina “cadena pesada variable” o “VH”.

En la presente memoria, “CDR” (del inglés “complementarity determining region”) o “región determinante de la complementariedad” hace referencia a una secuencia de aminoácidos que se encuentra en los dominios variables de los anticuerpos que da a los anticuerpos su especificidad para el antígeno.

En la presente memoria, “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)” hace referencia a una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo unido a una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.) capaz de generar un producto detectable a partir de un sustrato, por medio de un cambio de color o algún otro tipo de cambio, provocado por la acción enzimática sobre dicho sustrato. En dicha técnica puede existir un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario unido a dicha enzima. El antígeno se puede detectar indirectamente en la muestra mediante los cambios de color medidos por espectrofotometría.

La presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para la cuantificación de oxitocina libre y oxitocina unida a proteínas en una muestra, en el que dicho procedimiento comprende:

- (a) llevar a cabo un primer ensayo que comprende:
- añadir a dicha muestra un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la oxitocina libre, en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende:
 - una región CDR1 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6;
 - una región CDR2 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 8;
 - una región CDR3 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10;
 - una región CDR1 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16;
 - una región CDR2 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 18; y
 - una región CDR3 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 20;

- determinar la cantidad o concentración de anticuerpo monoclonal unido a la oxitocina libre; y
 - determinar la cantidad o concentración de oxitocina libre a partir de la cantidad o concentración de anticuerpo monoclonal unido a oxitocina libre;
- 5 (b) llevar a cabo un segundo ensayo, de forma simultánea o secuencial, en cualquier orden, que comprende:
- añadir a dicha muestra un anticuerpo policlonal que se une específicamente a la oxitocina unida a proteínas;
 - determinar la cantidad o concentración de anticuerpo policlonal unido a la oxitocina unida a proteínas; y
 - determinar la cantidad o concentración de oxitocina unida a proteínas a partir de la cantidad o concentración de anticuerpo policlonal unido a oxitocina unida a proteínas.
- 10
- 15 En una realización preferente del procedimiento de la invención, dicha oxitocina unida a proteína es oxitocina unida a albúmina.

En una realización preferente, el procedimiento de la invención comprende además:

- (c) sumar el valor de cantidad o concentración de oxitocina de oxitocina libre, obtenido en la etapa (a), y el valor de cantidad o concentración de oxitocina unida a proteínas, obtenido en la etapa (b).
- 20

En otra realización preferente, el procedimiento de la invención comprende además:

- (c) realizar una operación matemática entre el valor de cantidad o concentración de oxitocina de oxitocina libre, obtenido en la etapa (a), y el valor de cantidad o concentración de oxitocina unida a proteínas, obtenido en la etapa (b), tal como división o multiplicación.
- 25

El procedimiento de la invención evita tener que realizar un procedimiento de reducción/alquilación (R/A) para determinar la oxitocina libre, siendo esta una de las principales diferencias técnicas respecto al estado de la técnica, lo que posibilita que la cuantificación de oxitocina en el procedimiento de la invención sea más económica y rápida respecto a otros procedimientos. Consecuentemente, el procedimiento de la invención se diferencia de los métodos hasta ahora descritos en el estado de la técnica al poder hacerse en menos tiempo y con menos medios materiales. El procedimiento de la invención además

30

35

de poder ser implantando en cualquier laboratorio está especialmente indicado para ser llevado a cabo en modo ambulatorio, in situ, en las propias granjas de cría de animales.

5 El anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal tienen diferentes especificidades. Dichas diferencias en especificidad se derivan del diferente procedimiento de producción de dichos anticuerpos. Se ha utilizado oxitocina-KLH para las inmunizaciones y oxitocina-BSA para purificar el anticuerpo monoclonal y el policlonal. Sin embargo, en el procedimiento de producción del anticuerpo monoclonal se utiliza una fusión celular, un hibridoma, mientras que en el procedimiento de producción del anticuerpo policlonal se utiliza una inoculación
10 directa de oxitocina-KLH en un conejo, provocando así que el conejo produzca anticuerpos. Debido, por tanto, a las diferencias en el procedimiento de producción, ambos anticuerpos tienen especificidades diferentes.

En una realización del procedimiento de la invención, el dominio variable de la cadena pesada VH tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad respecto a la
15 secuencia SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de la cadena ligera VL tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 13.

En una realización del procedimiento de la invención, el dominio variable de la cadena pesada VH consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de la cadena ligera
20 VL consiste en la secuencia SEQ ID NO: 13.

En una realización del procedimiento de la invención, no resulta necesario someter a las muestras a ningún procesado previo.
25

Si las muestras están congeladas, se descongelan a temperatura ambiente dichas muestras previamente a la aplicación del método de la invención.

En una realización preferente del procedimiento de la invención, el anticuerpo monoclonal y/o el anticuerpo policlonal se añaden a una concentración en el rango 10-20 nM.
30

En otra realización preferente del procedimiento de la invención, el tiempo de incubación del anticuerpo monoclonal y/o el anticuerpo policlonal con la muestra es de entre 1 y 2 horas.

35 En una realización del procedimiento de la invención, se detecta la señal que emite la oxitocina de la muestra al unirse al anticuerpo monoclonal y/o al anticuerpo policlonal. Dicha

señal puede ser una señal de absorbancia o fluorescencia y se puede detectar con los métodos conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, en lectores de absorbancia o fluorescencia. La señal emitida por cada anticuerpo puede ser igual o diferente. La cantidad o concentración de oxitocina se determina, por métodos conocidos en el estado de la técnica, a partir del valor de dicha señal.

El procedimiento de la invención ofrece las siguientes ventajas:

- 10 (a) Permite determinar el valor total de la oxitocina presente en la muestra al determinar los dos tipos diferentes de oxitocina (libre y unida a proteínas), sin someter a la muestra a ningún tratamiento R/A previo a la medición, mientras que los métodos tradicionales sólo permiten la medición de la oxitocina libre, y cuando se somete a la muestra a un tratamiento R/A previo a la medición.
- 15 (b) Consigue medir, usando el mismo sistema analítico, ambos tipos de oxitocina de forma simultánea, o seriada y en cualquier orden (primero la oxitocina libre y luego la unida a proteínas, o viceversa, en el orden contrario, primero la unida a proteínas y luego la libre), lo que posibilita importantes ahorros de tiempo y también de materiales, siendo por tanto desde el punto de vista comercial más económico. La medición de forma simultánea se puede realizar uniendo cada anticuerpo a un
- 20 marcador diferente y usando las mismas etapas descritas anteriormente.

El procedimiento de la invención ha sido contrastado funcionalmente mediante la realización de pruebas de validación analítica. El procedimiento de la invención presenta una imprecisión, intra-ensayo e inter-ensayo, menor del 15%, es lineal, presenta porcentajes de recuperación de oxitocina entre el 80 y 120% y el límite de detección y cuantificación permite medir las concentraciones de oxitocina libre y unida a proteínas que normalmente están presentes en muestras biológicas. La correlación de los valores de oxitocina cuantificados con el ensayo con el anticuerpo monoclonal de la invención respecto a los cuantificados con el kit comercial ELISA de Cayman Chemical, que se emplea para medir oxitocina libre con un procesado previo por R/A, fue mayor de 0.9, valor indicativo de que los valores de los dos procedimientos tienen una elevada correlación.

En el procedimiento de la invención, el primer y segundo ensayos (con el anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal, o viceversa) se seleccionan del grupo que consiste en inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, luminiscencia, ensayo

homogéneo de proximidad luminiscente amplificada, inmunoelectrotransferencia, ELISA, western blot, nefelometría, inmunoturbidimetría, cromatografía lateral y micromatrices.

5 En el procedimiento de la invención, el primer y segundo ensayo (con el anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal, o viceversa) se llevan a cabo simultáneamente o secuencialmente.

10 En el procedimiento de la invención, el primer y segundo ensayo (con el anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal, o viceversa) se llevan a cabo en cualquier orden.

En el procedimiento de la invención, dicho anticuerpo monoclonal y/o dicho anticuerpo policlonal están unidos a una sonda de marcaje o a una esfera unida a una sonda de marcaje. Dichas sondas de marcaje pueden ser iguales o diferentes, para cada anticuerpo, monoclonal o policlonal.

15 En el procedimiento de la invención, dicha sonda de marcaje se selecciona del grupo que consiste en un fluoróforo, un cromóforo, una sonda bioluminiscente, una sonda radiactiva, una enzima y oro coloidal.

20 En el procedimiento de la invención, la muestra empleada para medir en ella su contenido en oxitocina total se selecciona del grupo que consiste en suero, plasma, saliva, orina y líquido cefalorraquídeo.

25 La presente invención también proporciona un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la oxitocina libre, en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende:

- una región CDR1 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6;
- una región CDR2 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 8;
- una región CDR3 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10;
- una región CDR1 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16;
- 30 - una región CDR2 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 18; y
- una región CDR3 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 20.

35 En una realización del anticuerpo monoclonal de la invención, el dominio variable de la cadena pesada VH tiene al menos un 95% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de la cadena ligera VL tiene al menos un 95% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 13.

En una realización del anticuerpo monoclonal de la invención, el dominio variable de la cadena pesada VH consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de la cadena ligera VL consiste en la secuencia SEQ ID NO: 13.

- 5 La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica para el anticuerpo monoclonal de la invención, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22, que codifica para el dominio variable de la cadena pesada y la secuencia SEQ ID NO: 23, que codifica para el dominio variable de la cadena ligera.
- 10 La presente invención también proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 22, que codifica para el dominio variable de la cadena pesada y la secuencia SEQ ID NO: 23, que codifica para el dominio variable de la cadena ligera, para uso en la producción del anticuerpo monoclonal de la invención.
- 15 La presente invención también proporciona un anticuerpo policlonal que se une específicamente a la oxitocina unida a proteínas.

El anticuerpo monoclonal y/o el anticuerpo policlonal de la invención están unidos a una sonda de marcaje o a una esfera unida a una sonda de marcaje.

- 20 Dicha sonda de marcaje unida al anticuerpo monoclonal y/o el anticuerpo policlonal de la invención se selecciona del grupo que consiste en un fluoróforo, un cromóforo, una sonda bioluminiscente, una sonda radiactiva, una enzima y oro coloidal. Dichas sondas de marcaje pueden ser iguales o diferentes, para cada anticuerpo, monoclonal o policlonal.

- 25 La presente invención también proporciona una composición que comprende el anticuerpo monoclonal y/o el anticuerpo policlonal de la invención.

- 30 La presente invención también proporciona dicha composición que comprende el anticuerpo monoclonal de la invención y/o el anticuerpo policlonal de la invención, para uso en la detección *in vitro* de oxitocina libre y de oxitocina unida a proteínas en una muestra.

La presente invención también proporciona un kit para detectar oxitocina libre y oxitocina unida a proteínas en una muestra, en el que dicho kit comprende:

- (i) el anticuerpo monoclonal y/o el anticuerpo policlonal o la composición de la invención que comprende cada uno de los anticuerpos, monoclonal y policlonal, o la combinación de ambos; y
- (ii) disoluciones tampón para llevar a cabo una reacción para formar un complejo entre el anticuerpo monoclonal y la oxitocina libre y/o entre el anticuerpo policlonal y la oxitocina unida a proteínas.

En el kit de la invención, dicho anticuerpo monoclonal y/o el anticuerpo policlonal están unidos a una sonda de marcaje o a una esfera unida a una sonda de marcaje.

En el kit de la invención, dicha sonda de marcaje se selecciona del grupo que consiste en un fluoróforo, un cromóforo, una sonda bioluminiscente, una sonda radiactiva, una enzima y oro coloidal. Dichas sondas de marcaje pueden ser iguales o diferentes, para cada anticuerpo, monoclonal o policlonal.

El kit de la invención además comprende reactivos para llevar a cabo la reacción para formar dichos complejos entre el anticuerpo monoclonal y la oxitocina libre y/o el anticuerpo policlonal y la oxitocina unida a proteínas y para llevar a cabo la detección de dichos complejos.

El kit puede integrar en un único dispositivo ambos anticuerpos, monoclonal y policlonal, o las composiciones que contienen cada anticuerpo, monoclonal y policlonal, o comprender dispositivos separados para cada anticuerpo o para cada composición que contiene cada anticuerpo, para llevar a cabo cada ensayo (a) o (b) del procedimiento de la invención y ambos dispositivos separados presentarse conjuntamente en un único envase o presentación, o presentarse por separado, cada uno en su propio envase o presentación.

El kit de la invención se utiliza sobre una muestra que se selecciona del grupo que consiste en suero, plasma, saliva, orina y líquido cefalorraquídeo.

El kit de la invención puede utilizarse en cualquier muestra biológica que pueda tener oxitocina.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el anticuerpo monoclonal de la invención para uso en la detección de oxitocina libre en una muestra.

Preferentemente, dicha muestra en la que se usa el anticuerpo monoclonal de la invención contiene oxitocina libre y oxitocina unida a proteínas.

Adicionalmente, la presente invención también proporciona el anticuerpo policlonal de la invención para uso en la detección in vitro de oxitocina unida a proteínas en una muestra.

Preferentemente, dicha muestra en la que se usa el anticuerpo policlonal de la invención contiene oxitocina libre y oxitocina unida a proteínas.

En una realización preferente, dicho anticuerpo monoclonal y/o dicho anticuerpo policlonal se usan unidos a una sonda de marcaje.

Dicha sonda de marcaje se selecciona del grupo que consiste en un fluoróforo, un cromóforo, una sonda bioluminiscente, una sonda radiactiva, una enzima y oro coloidal. Las sondas de marcaje pueden ser iguales o diferentes, para cada anticuerpo, monoclonal o policlonal.

En una realización, el kit de la invención es para uso en la detección in vitro, en una muestra, de oxitocina libre y oxitocina unida a proteínas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Resultados de las concentraciones de oxitocina en la saliva de los cerdos antes (No R/A) y después (R/A) del tratamiento R/A a las muestras de saliva con el ensayo AlphaLISA® que utiliza el anticuerpo monoclonal de la invención "P26C" (A), el ensayo AlphaLISA® que utiliza el anticuerpo policlonal de la invención "PO-10" (B) y el ensayo con el kit ELISA de Cayman Chemical (C). Los asteriscos indican diferencias significativas (**** $P \leq 0.0001$).

Figura 2. Cambios en las concentraciones de oxitocina en diferentes días antes y después del parto, en cerdas: día 58 de gestación (Día +58), día 7 después del parto (Día +7) y día 45 después del parto (Día +45) con el ensayo AlphaLISA® que utiliza el anticuerpo monoclonal de la invención antes (A) y después del tratamiento R/A (B), el ensayo AlphaLISA® que utiliza el anticuerpo policlonal de la invención antes (C) y después del tratamiento R/A (D) y el ensayo ELISA con el kit de Cayman Chemical después del

tratamiento R/A (E). Los asteriscos indican diferencias significativas (** $P \leq 0.001$ * $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$).

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

5 Materiales y métodos

Animales y muestras

Las muestras utilizadas en este estudio se obtuvieron de 10 cerdos hembra (*Sus scrofa domestica*), Blanco Grande. Los cerdos tuvieron acceso *ad libitum* a una dieta equilibrada y agua, con una temperatura entre 19-23°C y se tomaron muestras entre las 8:30 y las 10:00 h. Se tomó una muestra de cada cerdo 3 veces durante el estudio: el día 58 de gestación, el día 7 después del parto (durante la lactancia) y el día 45 después del parto. Los animales se alojaron en la granja experimental de la Universidad de Murcia (Murcia, España), en grupos con un espacio mínimo de 1,64 m² por animal en el día 58 de gestación e individualmente en los días 7 y 45 después del parto (recomendaciones descritas en la Directiva 2001/88/CE, 2001 y Directiva 2001/93/CE, 2001).

Se recogieron muestras de saliva usando tubos de Salivette (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co.) que contenían una esponja. Se permitió a los cerdos masticar la esponja, que se sujetó a una varilla de metal delgada y flexible, hasta que estuvo completamente húmeda (o al menos 1 minuto). Luego, las esponjas se colocaron en los tubos de Salivette que se centrifugaron inmediatamente a 3000 g durante 10 minutos a 4 °C. Seguidamente, se transfirió la saliva a tubos de 1,5 ml y se almacenó a -80 ° C hasta el análisis. En todos los casos se obtuvieron al menos 500 microlitros de saliva.

25 Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia.

Procedimiento de reducción/alquilación (R/A)

El procedimiento R/A se realizó siguiendo el protocolo descrito en Brandtzaeg et al. (2016). Se trataron 30 muestras de saliva de cerdos. Se diluyeron 100 µl de cada muestra en 200 µl de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8.0). Después, se añadieron 5 µl de ditiotreitól (DTT) 0,5 M (GE Healthcare Life Sciences) a 100 µl de la muestra de saliva diluida, se mezcló durante 30 segundos y se incubó a 37°C durante 45 minutos, seguido de enfriamiento a temperatura ambiente (22°C). Seguidamente, se añadieron 15 µL de 0.5 M yodoacetamida (IAM) (GE

Healthcare Life Sciences) a cada solución, se mezcló durante 30 segundos y se incubó a 22°C en oscuridad durante 20 minutos. Luego, se añadió a la solución acetonitrilo (ACN) al 80% (Scharlab, SL), en agua ultrapura (Millipore) (v/v), mantenido previamente en hielo, se mezcló durante 30 segundos y se centrifugó durante 15 minutos a 14,000 rpm en una centrífuga Eppendorf Sorvall ST 8R (Thermo Fisher Scientific). Después de la centrifugación, el sobrenadante se pipeteó en un nuevo Eppendorf y se evaporó a sequedad en un concentrador Speed Vac (Eppendorf Concentrator 5301) seguido de reconstitución en 100 µL de tampón fosfato salino (PBS). Las muestras tratadas se diluyeron 1: 2 con cada tampón correspondiente a cada ensayo.

10

Para evaluar si el procedimiento R/A podría afectar los ensayos utilizados en nuestro estudio independientemente del efecto que tiene sobre la oxitocina unida, el tampón de ensayo utilizado para cada ensayo se procesó utilizando el protocolo R/A y se analizó como una muestra desconocida en cada uno de los tres ensayos de nuestro estudio.

15

Ejemplo 1. Producción del anticuerpo monoclonal de la invención “P26C” que reconoce específicamente oxitocina libre

Generación del hibridoma

Se inmunizaron 3 ratones (BALB/c) con dos inyecciones intraperitoneales separadas por un intervalo de 15 días con 50 µg de Oxitocina-KLH (Cusabio) como antígeno, siendo KLH la hemocianina de lapa californiana (*Megathura crenulata*), del inglés *Keyhole Limpet haemocyanin*. El antígeno se emulsionó con adyuvante completo de Freund (CCF, Sigma F-5881) en la primera inyección, y con adyuvante incompleto de Freund (CIF, Sigma F-5506) para la segunda inyección intraperitoneales. La inmunización final consistió en una inyección intravenosa o intraesplénica de 50 µg de antígeno sin el adyuvante.

25

Tres días después, se extrajo el bazo de los ratones y las células se fusionaron con la línea celular de mieloma murino Sp2/0-Ag14, desarrollada a partir de ratones BALB/c no secretores de inmunoglobulinas utilizando polietilenglicol en solución al 50% (Sigma). Los hibridomas fueron seleccionados mediante su crecimiento en medio RPMI 1640 (Biowhitaker) que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT), que se complementó con suero fetal bovino al 10% (Gibco), glutamina 2 mM (Gibco), piruvato 1 mM (Sigma), y penicilina/streptomycin 1% (Gibco). En el medio HAT con aminopterina, sólo crecen las células híbridas, formadas por linfocitos B y células de mieloma, gracias a que los linfocitos

30

B poseen todo el panel de enzimas de las vías de rescate de síntesis del DNA y, por lo tanto, pueden utilizar la hipoxantina y timidina del medio.

Finalmente, los sobrenadantes de los hibridomas se analizaron mediante ensayo ELISA para comprobar la presencia de hibridomas secretores de inmunoglobulinas anti-oxitocina. Los hibridomas positivos se clonaron mediante dilución límite y fueron expandidos y congelados en nitrógeno líquido.

Identificación del anticuerpo monoclonal

10 Se realizó un análisis de los sobrenadantes de los hibridomas generados mediante ensayo ELISA indirecto empleando Oxitocina-BSA. Para ello, en microplacas de 96 pocillos de fondo plano Nunc (Maxisorp), se incubaron con 50 µl de Oxitocina-BSA (250 ng antígeno por pocillo) en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.8 durante toda la noche, a 4°C, para permitir la correcta adhesión de las proteínas a la placa. Posteriormente las placas fueron lavadas con 100 µl de PBS/Tween 20 al 0.05% y bloqueadas durante 30 minutos a 37°C con 100 µl de tampón de bloqueo fosfato salino (PBS) con 5% leche en polvo. A continuación, las placas se incubaron 1 hora a 37°C, con 100 µl por pocillo de cada sobrenadante procedente de los hibridomas. Seguidamente, se realizaron tres lavados con tampón PBS/Tween 20 al 0.1%. Entonces, se añadió 100 µl por pocillo de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano a una dilución 1:2500 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con tampón PBS/Tween 20 al 0.1%, para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, se añadió el sustrato enzimático en solución (citrato sódico 0,1M, ácido cítrico 0,1 M, 2,2'-azino-bis(3-
20 etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) y H₂O₂). Posteriormente se midió la absorbancia (OD) en un espectrofotómetro (BioTek) a una longitud de onda de 405 nm cada 5 minutos hasta un total de 25 minutos.

Se identificó el anticuerpo específico anti-oxitocina en el sobrenadante del hibridoma P26C en dicho ensayo ELISA indirecto empleando oxitocina-BSA. Se seleccionó el clon P26C porque se obtuvo la mayor señal de absorbancia con dicho clon en dicho ensayo ELISA, lo que indicaba una mayor afinidad por la oxitocina que el resto de clones.

Se realizó un ensayo dot-blot con el clon P26C, con el que se determinó que tenía reactividad frente a oxitocina de alto número de especies como de cerdo, perro y caballo y oxitocina humana.

35

Purificación del anticuerpo monoclonal P26C

Para la purificación del anticuerpo monoclonal P26C a partir del sobrenadante obtenido del hibridoma seleccionado, se usó una columna de afinidad HiTrap™ Protein G HP (GE Healthcare Life Sciences) usando un sistema de cromatografía ÄKTA pure (GE Healthcare Life Sciences).

Caracterización estructural del anticuerpo monoclonal P26C

El ARN total se extrajo de las células de hibridoma y el ADNc se sintetizó posteriormente. Después, se amplificaron los dominios variables del anticuerpo monoclonal por PCR específica de isotipo, se subclonaron en un vector de clonación estándar por separado y se secuenciaron. Se determinó que el isotipo del anticuerpo monoclonal era IgGκ. Se secuenciaron los dominios variables de 5 clones y se encontró que la secuencia era idéntica en los 5 clones. La Tabla 1 muestra los detalles de la secuencia del anticuerpo monoclonal P26C.

15

Tabla 1

Fragmento/Región/Secuencia	SEQ ID NO
Dominio variable de la cadena pesada VH incluyendo péptido señal	SEQ ID NO: 2
Dominio variable de la cadena pesada VH	SEQ ID NO: 3
Péptido señal de la cadena pesada VH	SEQ ID NO: 4
Región marco FR1 de la cadena pesada VH	SEQ ID NO: 5
Región CDR1 de la cadena pesada VH	SEQ ID NO: 6
Región marco FR2 de la cadena pesada VH	SEQ ID NO: 7
Región CDR2 de la cadena pesada VH	SEQ ID NO: 8
Región marco FR3	SEQ ID NO: 9
Región CDR3 de la cadena pesada VH	SEQ ID NO: 10
Región marco FR4 de la cadena pesada VH	SEQ ID NO: 11
Dominio variable de la cadena ligera VL incluyendo péptido señal	SEQ ID NO: 12
Péptido señal	SEQ ID NO: 12
Dominio variable de la cadena ligera VL	SEQ ID NO: 13
Péptido señal de la cadena ligera VL	SEQ ID NO: 14
Región marco FR1 de la cadena ligera VL	SEQ ID NO: 15
Región CDR1 de la cadena ligera VL	SEQ ID NO: 16
Región marco FR2 de la cadena ligera VL	SEQ ID NO: 17
Región CDR2 de la cadena ligera VL	SEQ ID NO: 18
Región marco FR3 de la cadena ligera VL	SEQ ID NO: 19
Región CDR3 de la cadena ligera VL	SEQ ID NO: 20
Región marco FR4 de la cadena ligera VL	SEQ ID NO: 21
Secuencia nucleotídica que codifica para el fragmento variable de la cadena pesada VH incluyendo péptido señal	SEQ ID NO: 22
Secuencia nucleotídica que codifica para el fragmento variable de la cadena ligera VL incluyendo péptido señal	SEQ ID NO: 23

Ejemplo 2. Determinación de las concentraciones de oxitocina libre en muestras de saliva

Se descongelaron a temperatura ambiente las muestras de saliva descritas en el apartado Materiales y Métodos y se diluyeron 10 μ L de muestra 1:2 en tampón de ensayo (AlphaLISA® Universal buffer, Perkin elmer, Inc.). Se realizó un ensayo AlphaLISA® (Perkin Elmer, Inc.), en placas de 96 pocillos, con un volumen de reacción de 50 μ L por pocillo, utilizando esferas recubiertas con el anticuerpo monoclonal P26Cy se determinaron las concentraciones de oxitocina en las muestras.

10 Ejemplo 3. Producción del anticuerpo policlonal de la invención “PO-10” que reconoce específicamente oxitocina unida a proteínas

Se inmunizó un conejo de Nueva Zelanda (hembra, 2,5 kg, 3 meses de edad) con un conjugado oxitocina-KLH (Cusabio) como antígeno, usando 150 μ g mezclados en adyuvante completo de Freund para la primera inyección y adyuvante incompleto de Freund para la segunda y sucesivas inyecciones. Una semana después de cada inmunización, se recogieron varias muestras de sangre y se realizó un análisis por ensayo ELISA para evaluar el título de anticuerpos empleando placas recubiertas con oxitocina-BSA y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano.

20 Purificación del anticuerpo policlonal

Se usó una columna de afinidad HiTrap™ HP (GE Healthcare Life Sciences) activada por N-hidroxisuccinimida (NHS) a la que se acopló oxitocina-BSA (Cusabio) y se pasaron lotes de 1 ml de antisuero de oxitocina de conejo a través de la columna usando un sistema de cromatografía ÄKTA pure (GE Healthcare Life Sciences).

25

Ejemplo 4. Determinación de las concentraciones de oxitocina unida a proteínas en muestras de saliva

Se descongelaron a temperatura ambiente las muestras de saliva descritas en el apartado Materiales y Métodos y se diluyeron 10 μ L de muestra en tampón de ensayo (AlphaLISA® immunoassay buffer, Perkin Elmer Inc.). Se realizó un ensayo de competencia indirecta AlphaLISA® (Perkin Elmer, Inc.) en placas de 96 pocillos, con un volumen final de reacción de 50 μ L por pocillo, utilizando perlas recubiertas con proteína G (Perkin Elmer Inc.) y se determinaron las concentraciones de oxitocina en las muestras. Se ensayaron diferentes concentraciones de oxitocina biotinilada (0-6 nM) y del anticuerpo policlonal de la invención

PO-10 (10-20 nM). Se utilizaron diferentes concentraciones de perlas de donante (Perkin Elmer Inc.) y perlas de aceptador recubiertos con proteína G a concentraciones entre 20-40 µg/ml.

5 **Ejemplo 5. Medición de oxitocina con el procedimiento de la invención. Ensayo comparativo con el kit ELISA de Cayman Chemical**

La imprecisión se calculó como variaciones entre ensayos e intra-ensayos y se expresó como coeficientes de variación (CV). Se analizaron cinco réplicas de cada muestra (muestras de saliva baja, media y alta) al mismo tiempo, para determinar la precisión intra-ensayo del método. Cinco alícuotas de cada muestra de saliva se almacenaron en viales de plástico a -80°C hasta el análisis. El día del análisis, las muestras se llevaron a temperatura ambiente antes de la medición de oxitocina. Estas muestras se midieron por duplicado cinco veces durante cinco días diferentes para determinar la precisión entre ensayos usando curvas de calibración recién preparadas.

15

La precisión se evaluó mediante la evaluación de la linealidad después de los experimentos de dilución y recuperación. Para la evaluación de linealidad se diluyeron en serie dos muestras con valores altos y medios de oxitocina. Las diluciones fueron de 1:4 hasta 1:128 y de 1:2 hasta 1:64 con tampón de ensayo (AlphaLISA® immunoassay buffer, Perkin Elmer Inc.) para la muestra de valor alto y medio, respectivamente. Para la prueba de recuperación, se diluyó (1:2) una muestra de saliva de cerdo con una concentración conocida de oxitocina con diferentes cantidades de estándar de oxitocina (120, 80, 40, 20 y 10 ng/l). Luego se calcularon los porcentajes de las concentraciones de oxitocina medidas a las concentraciones de oxitocina esperadas.

25

El límite de detección (LD) se calculó a partir de 12 determinaciones de oxitocina replicadas de tampón de ensayo (AlphaLISA® immunoassay buffer, Perkin Elmer Inc.) como valor medio más 3 desviación estándar (DE). El límite bajo de cuantificación (LLOQ) se calculó en función de la concentración de oxitocina más baja que se pudo medir con una precisión del 20%. Para esto, una muestra de saliva se diluyó en serie con tampón de ensayo y se analizó cinco veces al mismo tiempo para cada dilución.

35

Se utilizó un kit ELISA disponible comercialmente de Cayman Chemical para la medición de oxitocina con fines comparativos dentro de la validación.

Comportamiento de los tres ensayos del estudio con oxitocina sintética y vasopresina

El comportamiento de cada ensayo para la medición de la oxitocina sintética se evaluó mediante el uso de una solución que contiene 16,6 µg/ml (dato proporcionado por el fabricante) de oxitocina sintética disponible en el mercado (SYVA S.A.U., León, España).

5

La especificidad analítica de los ensayos se probó mediante mediciones de diluciones en serie de una solución que contenía 100 UI/ml de vasopresina (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

10 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de diferentes días de gestación y lactancia se evaluaron para determinar la normalidad de la distribución, utilizando la prueba de Shapiro-Wilk, lo que proporciona una distribución no paramétrica. Los resultados por debajo del límite de detección se establecieron en el límite de detección de cada método. Los valores se transformaron logarítmicamente y se usó la prueba t pareada para las diferencias entre antes y después del procedimiento R/A dentro de cada método. A los valores transformados logarítmicamente, se les aplicó un ANOVA de medidas repetidas unidireccionales, seguido de LSD de Fisher sin corregir para comparar los valores de oxitocina obtenidos en diferentes momentos en el día 58 antes del parto y los días 7 y 45 después del parto. Los coeficientes de correlación de Spearman se calcularon para evaluar la correlación entre los tres métodos antes y después del procedimiento R/A (GraphPad Prism 5.00 para Windows).

En el inmunoensayo con el anticuerpo policlonal, los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo estaban en el rango 4.36-11.37% y los coeficientes de variación inter-ensayo estaban en el rango 8.52-13.38%. La dilución de las muestras de saliva dio como resultado ecuaciones de regresión lineal con un coeficiente de correlación que oscilaba entre 0,98 y 0,99. Los coeficientes beta fueron significativamente distintos de cero y la prueba de ejecución no mostró desviación de la linealidad. Los resultados de recuperación obtenidos fueron entre 80% y 116% y el límite de detección del ensayo fue 58,4 pg/ml.

30

En el ensayo con el kit comercial de Cayman Chemical, los coeficientes de variación intra-ensayo estaban en el rango 11,34-15,72% y los coeficientes de variación inter-ensayo estaban en el rango 18,56-21,04%. La dilución de las muestras de saliva dio como resultado ecuaciones de regresión lineal con un coeficiente de correlación de 0,99. Los coeficientes

beta fueron significativamente distintos de cero y la prueba de ejecución no mostró desviación de la linealidad y el límite de detección del ensayo fue de 4,66 pg/ml

5 Cuando se midió una solución de oxitocina sintética mediante los diferentes ensayos, los resultados fueron 451,4 pg/ml con el método monoclonal AlphaLISA®, 6480 pg/ml con el método policlonal AlphaLISA®. Cuando se usó el ELISA comercial de Cayman Chemical, los resultados estaban fuera de su límite de detección.

10 Cuando se midieron las diluciones de vasopresina en los tres métodos probados, se obtuvieron valores por debajo del límite de detección en todos los casos.

Efectos del tratamiento R/A

15 Los resultados obtenidos en las muestras aparecen en la Figura 1. En el ensayo AlphaLISA® con el anticuerpo monoclonal, las concentraciones de oxitocina de las muestras no mostraron diferencias significativas ($P=0,0634$) entre muestras con procedimiento R/A (valor medio de 702,9 pg/mL) y sin procedimiento R/A (valor medio de 882,1 pg/ml). En el ensayo AlphaLISA® con el anticuerpo policlonal, las concentraciones de oxitocina de las muestras con el procedimiento R/A (valor medio de 1308 pg/ml) fueron significativamente más bajas ($P<0,0001$) que las obtenidas sin el procedimiento R/A (valor medio de 13492

20 pg/ml). Finalmente, en el ensayo con el kit comercial de Cayman Chemical, las concentraciones de oxitocina ($P<0,0001$) fueron significativamente mayores en muestras con procedimiento R/A (valor medio de 320,4 pg/mL) en comparación con aquellas sin procedimiento R/A (valor medio de 11,8 pg/mL). Solo 6 de un total de 30 muestras sin procedimiento R/A dan resultados por encima del límite de detección de este método y en

25 las muestras por debajo del límite de detección se utilizó el valor del límite de detección del ensayo para el estudio estadístico.

30 Cuando se analizaron los tampones, las muestras dieron un resultado bajo el límite de detección antes y después del procedimiento R/A en los tres ensayos.

Respuesta biológica de cada ensayo

La respuesta biológica de las concentraciones de oxitocina con cada ensayo se muestra en la Figura 2.

En el ensayo AlphaLISA® con el anticuerpo monoclonal sin procedimiento R/A, las concentraciones de oxitocina salival aumentaron significativamente en el día 7 después del parto, con un valor medio de 1153 pg/ml, en comparación con el día 58 de gestación (valor medio de 862 pg/ml) (1,34 veces; $P=0,038$) y el día 45 después del parto (valor medio de 763 pg/mL) (1,51 veces; $P=0,0038$). Cuando este método se aplicó con el procedimiento R/A, la concentración de oxitocina salival aumentó significativamente en el día 7 después del parto, con un valor medio de 701,4 pg/ml, en comparación con el día 58 de gestación (valor medio de 524,1 pg/ml) (1,34 veces; $P=0,0159$) y el día 45 después del parto (valor medio de 552,1 pg/ml) (1,27 veces; $P=0,0138$).

10

En el ensayo AlphaLISA® con el anticuerpo policlonal sin procedimiento R/A, las concentraciones de oxitocina salival aumentaron significativamente en el día 7 después del parto, con un valor medio de 25695 pg/ml, en comparación con el día 58 de gestación (valor medio de 6896 pg/ml) (3,72 veces; $P=0,0007$) y el día 45 después del parto (valor medio de 5939 pg/mL) (4,33 veces; $P=0,0001$). Cuando se aplicó el procedimiento R/A a este ensayo, las concentraciones de oxitocina salival aumentaron significativamente en el día 7 después del parto, con un valor medio de 1677 pg/ml, en comparación con el día 58 de gestación (valor medio de 534,8 pg/ml) (3,14 veces; $P=0,0003$) y el día 45 después del parto (valor medio de 906,5 pg/mL) (1,85 veces; $P=0,0157$).

20

Finalmente, cuando el kit ELISA de Cayman Chemical se usó sin el procedimiento R/A, solo 6 de las muestras analizadas estaban por encima del límite de detección, por lo que no fue posible aplicar estas condiciones para evaluar posibles cambios biológicos. En el ensayo ELISA con el kit de Cayman Chemical con procedimiento R/A, las concentraciones de oxitocina salival aumentaron significativamente en el día 7 después del parto, con un valor medio de 448,6 pg/ml, en comparación con el día 45 después del parto (valor medio de 208,8 pg/ml) (2,15 veces; $P=0,039$) pero no hubo diferencias significativas con el día 58 de gestación (valor medio de 275,5 pg/mL) (1,63 veces; $P=0,1999$).

30 El resumen de correlaciones entre los procedimientos se muestra en la Tabla 2. Los asteriscos indican la significancia estadística ($***P \leq 0.001$; $**P \leq 0.01$; $*P \leq 0.05$).

Tabla 2

	AlphaLISA monoclonal no R/A	AlphaLISA monoclonal R/A	AlphaLISA policlonal no R/A	AlphaLISA policlonal R/A	Kit Cayman no R/A	Kit Cayman R/A
AlphaLISA monoclonal no R/A		0.65***	0.63***	0.39*	0.51***	0.67***
AlphaLISA monoclonal R/A			0.68***	0.58***	0.47**	0.53***
AlphaLISA policlonal no R/A				0.48**	0.25	0.44**
AlphaLISA policlonal R/A					0.28	0.34
Kit Cayman no R/A						0.36*

Cuando no se realizó el procedimiento R/A a las muestras, el ensayo AlphaLISA® con el anticuerpo monoclonal mostró una correlación moderada significativa tanto con el ensayo

 5 AlphaLISA® con el anticuerpo policlonal ($P < 0.001$; $r = 0.63$) como con el ensayo con el kit ELISA de Cayman Chemical ($P < 0.001$; $r = 0.51$). No se encontró una correlación significativa entre el ensayo AlphaLISA® con el anticuerpo policlonal y con el ensayo con el kit ELISA de Cayman Chemical. Cuando se realizó el procedimiento R/A, el ensayo AlphaLISA® con el anticuerpo monoclonal mostró una correlación moderada significativa

 10 tanto con el ensayo AlphaLISA® con el anticuerpo policlonal ($P < 0.001$; $r = 0.58$) como con el ensayo con el kit ELISA de Cayman Chemical ($P < 0.001$; $r = 0.53$). No se encontró una correlación significativa entre el ensayo AlphaLISA® con el anticuerpo policlonal y el ensayo con el kit ELISA de Cayman Chemical.

15 LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brandtzaeg et al. (2016). Proteomics tools reveal startlingly high amounts of oxytocin in plasma and serum. *Sci Rep*, 6, 31693.
- López-Arjona et al. (2020). Oxytocin in saliva of pigs: an assay for its measurement and changes after farrowing. *Domest Anim Endocrinol*, 70, 106384.
- 20 MacLean et al. (2018). Validation of salivary oxytocin and vasopressin as biomarkers in domestic dogs. *J Neurosci Methods*, 293, 67-76.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para la cuantificación de oxitocina libre y oxitocina unida a proteínas en una muestra, en el que dicho procedimiento comprende:

(a) llevar a cabo un primer ensayo que comprende:

5

- añadir a dicha muestra un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la oxitocina libre, en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende:

- una región CDR1 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6;

10

- una región CDR2 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 8;

- una región CDR3 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10;

15

- una región CDR1 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16;

- una región CDR2 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 18; y

- una región CDR3 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 20;

20

- determinar la cantidad o concentración de anticuerpo monoclonal unido a la oxitocina libre; y

- determinar la cantidad o concentración de oxitocina libre a partir de la cantidad o concentración de anticuerpo monoclonal unido a dicha oxitocina libre;

25

y

(b) llevar a cabo un segundo ensayo que comprende:

- añadir a dicha muestra un anticuerpo policlonal que se une específicamente a la oxitocina unida a proteínas;

30

- determinar la cantidad o concentración de anticuerpo policlonal unido a la oxitocina unida a proteínas; y

- determinar la cantidad o concentración de oxitocina unida a proteínas a partir de la cantidad o concentración de anticuerpo policlonal unido a dicha oxitocina unida a proteínas.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena pesada VH tiene al menos un 95% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de la cadena ligera VL tiene al menos un 95% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 13.
5
3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el dominio variable de la cadena pesada VH consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de la cadena ligera VL consiste en la secuencia SEQ ID NO: 13.
- 10 4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el primer y segundo ensayos se seleccionan del grupo que consiste en inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunocromatografía, luminiscencia, ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada, inmunoelectrotransferencia, ELISA, western blot, nefelometría, inmunoturbidimetría, cromatografía lateral y micromatrices.
15
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el primer y segundo ensayos se llevan a cabo simultáneamente o secuencialmente.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el primer y
20 segundo ensayo se llevan a cabo en cualquier orden.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho anticuerpo monoclonal y/o dicho anticuerpo policlonal están unidos a una sonda de marcaje o a una esfera unida a una sonda de marcaje.
25
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicha sonda de marcaje se selecciona del grupo que consiste en un fluoróforo, un cromóforo, una sonda bioluminiscente, una sonda radiactiva, una enzima y oro coloidal.
- 30 9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que las sondas de marcaje pueden ser iguales o diferentes, para cada anticuerpo, monoclonal o policlonal
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en suero, plasma, saliva, orina y líquido
35 cefalorraquídeo.

11. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la oxitocina libre, en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende:
- una región CDR1 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6;
 - una región CDR2 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 8;
 - 5 - una región CDR3 de la cadena pesada que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10;
 - una región CDR1 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 16;
 - una región CDR2 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 18; y
 - una región CDR3 de la cadena ligera que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 20.
- 10 12. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 11, en el que el dominio variable de la cadena pesada VH tiene al menos un 95% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de la cadena ligera VL tiene al menos un 95% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 13.
- 15 13. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 11 o 12, en el que el dominio variable de la cadena pesada VH consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de la cadena ligera VL consiste en la secuencia SEQ ID NO: 13.
- 20 14. Un polinucleótido que codifica para el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende la secuencia SEQ ID NO: 22, que codifica para el dominio variable de la cadena pesada y la secuencia SEQ ID NO: 23, que codifica para el dominio variable de la cadena ligera.
- 25 15. Un polinucleótido según la reivindicación 14, para uso en la producción de un anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 11-13.
16. Un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, para uso en la detección de oxitocina libre en una muestra.
- 30 17. Un anticuerpo policlonal que se une específicamente a la oxitocina unida a proteínas.
18. Un anticuerpo policlonal según la reivindicación 17, para uso en la detección *in vitro* de oxitocina unida a proteínas en una muestra.
- 35 19. El anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 11-13 y/o el anticuerpo policlonal según la reivindicación 17, para uso, según las reivindicaciones 16

o 18, en el que dicho anticuerpo monoclonal y/o dicho anticuerpo policlonal están unidos a una sonda de marcaje; y dicha sonda de marcaje es igual o diferente para cada uno de los anticuerpos, monoclonal y policlonal.

- 5 20. El anticuerpo monoclonal y/o el anticuerpo policlonal para uso, según la reivindicación 19, en el que dicha sonda de marcaje se selecciona del grupo que consiste en un fluoróforo, un cromóforo, una sonda bioluminiscente, una sonda radiactiva, una enzima y oro coloidal.
- 10 21. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 11-13 y/o el anticuerpo policlonal según la reivindicación 17.
22. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 11-13 y/o el anticuerpo policlonal según la reivindicación 17, para uso en la detección *in*
15 *vitro* de oxitocina libre y de oxitocina unida a proteínas en una muestra.
23. Un kit para detectar oxitocina libre y oxitocina unida a proteínas en una muestra, en el que dicho kit comprende:
- (i) el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 11-13 y/o el
20 anticuerpo policlonal según la reivindicación 17 o la composición según la reivindicación 21, que comprende uno u otro anticuerpo, monoclonal o policlonal, o ambos en combinación; y
- (ii) disoluciones tampón para llevar a cabo las reacciones para formar un complejo entre el anticuerpo monoclonal y la oxitocina libre y/o el anticuerpo policlonal y la oxitocina
25 unida a proteínas.
24. El kit según la reivindicación 23, en el que dicho anticuerpo monoclonal y/o el anticuerpo policlonal están unidos a una sonda de marcaje o a una esfera unida a una sonda de marcaje.
- 30 25. El kit según la reivindicación 24, en el que dicha sonda de marcaje se selecciona del grupo que consiste en un fluoróforo, un cromóforo, una sonda bioluminiscente, una sonda radiactiva, una enzima y oro coloidal; y dicha sonda de marcaje es igual o diferente para cada uno de los anticuerpos, monoclonal y policlonal.

35

26. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23-25, que además comprende reactivos para llevar a cabo la reacción para formar dichos complejos entre el anticuerpo monoclonal y la oxitocina libre y/o el anticuerpo policlonal y la oxitocina unida a proteínas y para llevar a cabo la detección de dichos complejos.

5

27. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23-26, en el que dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en suero, plasma, saliva, orina y líquido cefalorraquídeo.

10 28. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23-27, que puede integrar en un único dispositivo ambos anticuerpos, monoclonal y policlonal, o las composiciones que contienen cada anticuerpo, monoclonal y policlonal, o comprender dispositivos separados para cada anticuerpo o para cada composición que contiene cada anticuerpo y ambos dispositivos separados presentarse conjuntamente en un único envase o
15 presentación, o presentarse por separado, cada uno en su propio envase o presentación.

29. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 23-28 para uso en la detección *in vitro* de oxitocina libre y de oxitocina unida a proteínas en una muestra.

20

FIGURA 1

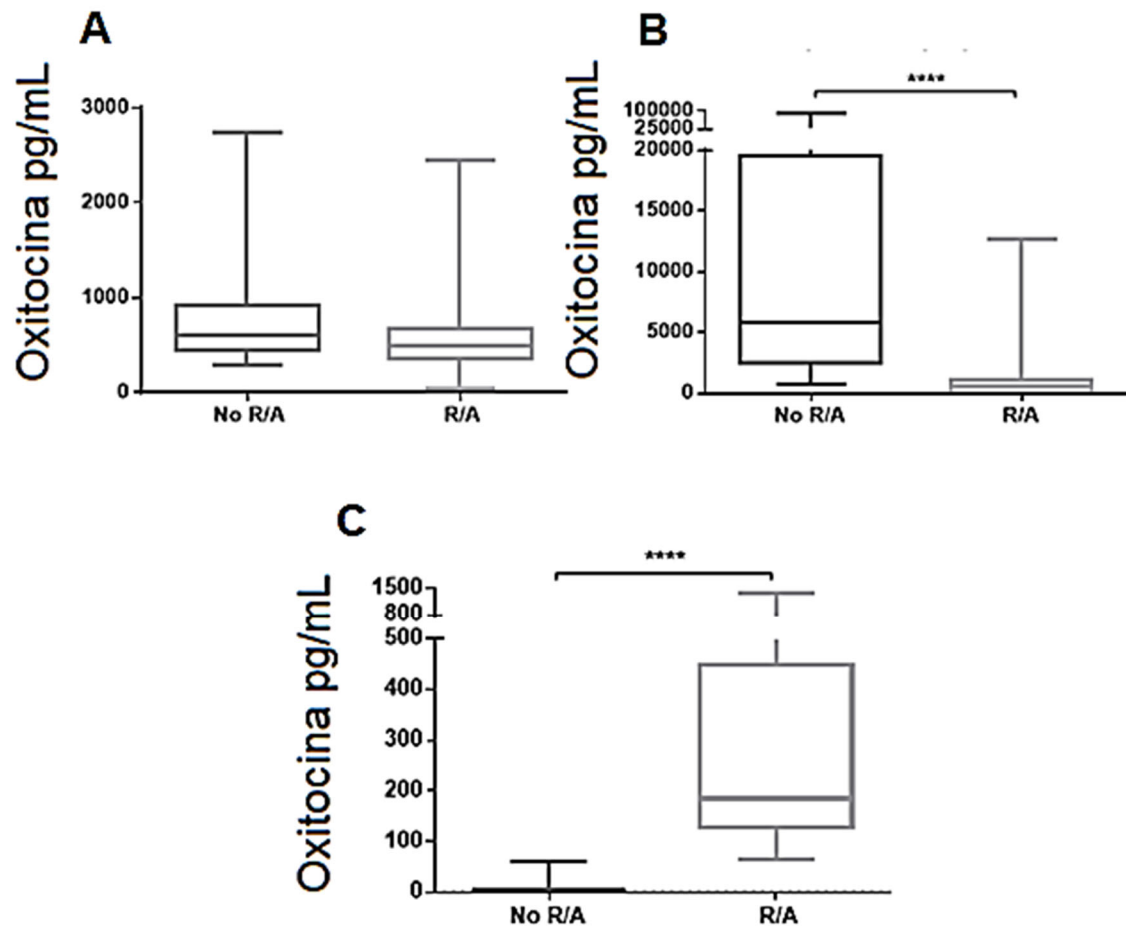
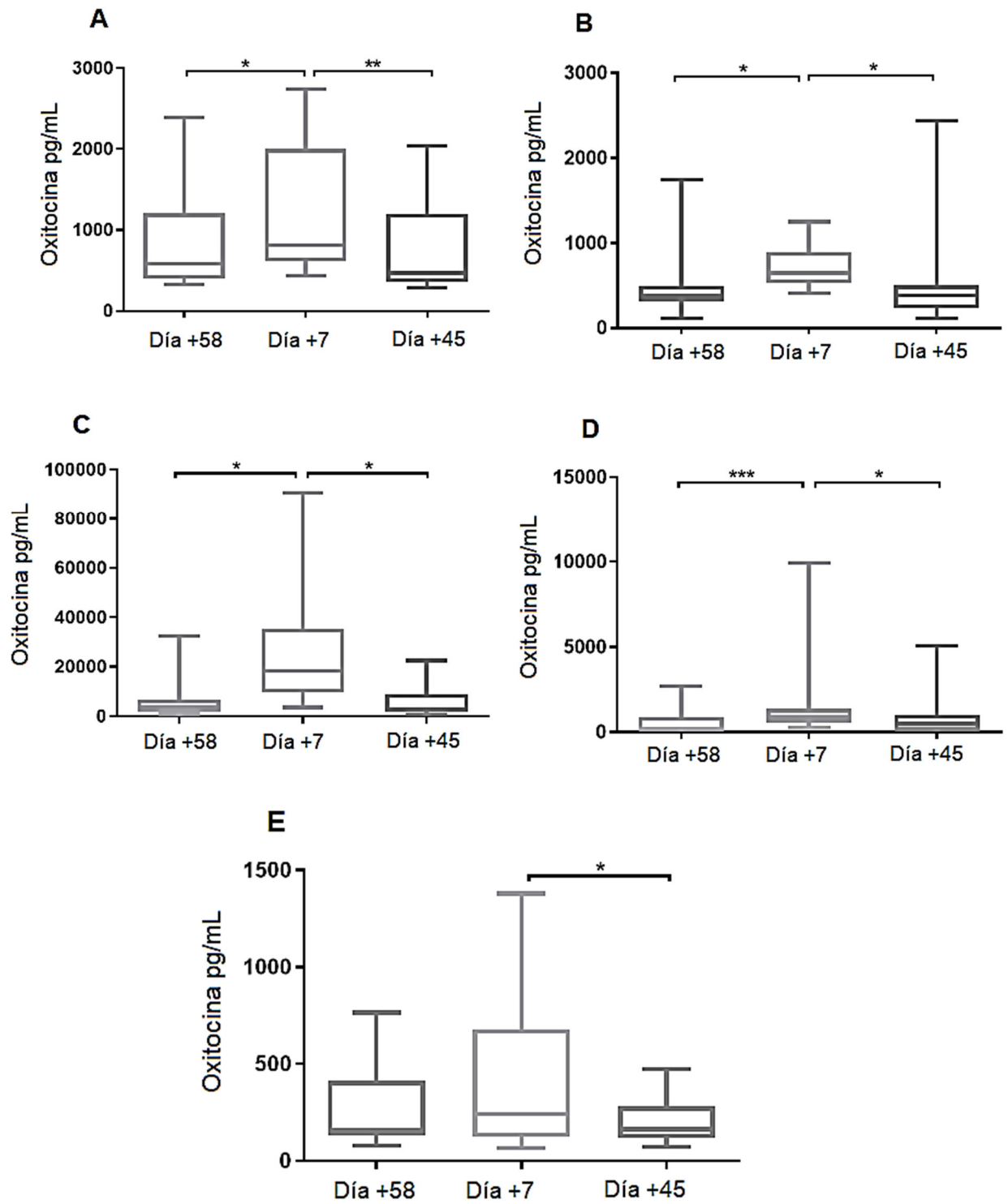


FIGURA 2





- ① N.º solicitud: 202030265
② Fecha de presentación de la solicitud: 01.04.2020
③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **C07K16/26** (2006.01)
G01N33/74 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
D,X		BRANDTZAEG, O. K. et al. Proteomics tools reveal startlingly high amounts of oxytocin in plasma and serum. Scientific Reports. Agosto 2016, Vol. 6, Artículo N° 31693. ISSN 2045-2322 (impreso), ISSN 2045-2322 (electrónico), <DOI: 10.1038/srep31693>. Todo el documento.	1-10, 23-29
D,A			11-22
D,X		LOPEZ-ARJONA, M. et al. Oxytocin in saliva of pigs: an assay for its measurement and changes after farrowing. Domestic Animal Endocrinology. Enero 2020, Vol. 70, Artículo N° 106384. ISSN 0739-7240, <DOI:10.1016/j.domaniend.2019.106384>. Especialmente apartado 2.1.	11-22
D,A			1-10, 23-29
X		BURGEON, E. et al. Monoclonal antibodies to oxytocin: production and characterization. Journal of Neuroimmunology. Marzo 1991, Vol. 31, N° 3, páginas 235 - 244. ISSN 0165-5728, <DOI: 10.1016/0165-5728(91)90045-9>. Especialmente página 239, columna izquierda; página 240, columna derecha.	11-22
A			1-10, 23-29
X		HARAYA, S. et al. Development of a highly specific enzyme immunoassay for oxytocin and its use in plasma samples. Annals of Clinical Biochemistry. Enero 2017, Vol. 54, N° 1, páginas 101 - 106. ISSN 1758-1001 (electrónico), <DOI: 10.1177/0004563216645122>. Especialmente página 102, columna derecha; página 105.	11-22
A			1-10, 23-29
A		LÜRZEL, S. et al. Salivary oxytocin in pigs, cattle, and goats during positive human-animal interactions. Psychoneuroendocrinology. Mayo 2020, Vol. 115, Artículo N° 104636. ISSN 1873-3360 (electrónico), <Doi:10.1016/j.psyneuen.2020.104636> Publicado en línea en Marzo 2020. Especialmente apartado 3.1	1-29
A		MACLEAN, E. L. et al. Challenges for measuring oxytocin: The blind men and the elephant? Psychoneuroendocrinology. Septiembre 2019, Vol. 107, páginas 225 - 231. ISSN 0306-4530, <DOI:10.1016/j.psyneuen.2019.05.018>. Todo el documento.	1-29

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
D: documento citado por el solicitante en la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.07.2020

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/3



- ②¹ N.º solicitud: 202030265
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 01.04.2020
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C07K16/26** (2006.01)
G01N33/74 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LENG, G. et al. Measuring oxytocin and vasopressin: bioassays, immunoassays and random numbers. Journal of Neuroendocrinology. Octubre 2016, Vol. 28, Nº 10, Artículo Nº 10.1111/jne.12413. ISSN 0953-8194 (impreso), ISSN 1365-2826 (electrónico), <DOI: doi:10.1111/jne.12413>. Especialmente página 5, columna izquierda; página 7 columna derecha - página 8; página 9, columna derecha.	1-29
A	SZETO, A. et al. Evaluation of enzyme immunoassay and radioimmunoassay methods for the measurement of plasma oxytocin. Psychosomatic Medicine. Junio 2011, Vol. 73, Nº 5, páginas 393 - 400. ISSN 0033-3174 (impreso), ISSN 1534-7796 (electrónico), <DOI: 10.1097/PSY.0b013e31821df0c2>. Author Manuscript. [en línea] [publicado el 02.06.2012] Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3118424/>. Especialmente apartado "Discussion"	1-29

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
 D: documento citado por el solicitante en la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.07.2020

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
2/3

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

C07K, 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, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, DGENE, REGISTRY, UNIPROTKB, NRPL1, UNIPARC