

“ANTICUERPOS IGY NANOCONJUGADOS PARA LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL”

Campo de la invención

La presente invención se inscribe en el campo de la medicina y el diagnóstico in vitro, particularmente en el área de métodos para la detección de biomarcadores urinarios asociados al daño renal.

Estado de la técnica

En el estado de la técnica se conocen diversos métodos para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades renales basados en la detección de biomarcadores presentes en muestras biológicas, particularmente en orina. Entre dichos métodos se encuentran los inmunoensayos turbidimétricos, ensayos enzimáticos y métodos colorimétricos que emplean anticuerpos específicos contra proteínas asociadas al daño renal, tales como la cistatina C, la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), la osteopontina y la nefrina.

Algunos documentos describen el uso de anticuerpos conjugados a partículas sólidas o nanopartículas para mejorar la sensibilidad de detección, así como el empleo de plataformas automatizadas de laboratorio clínico. No obstante, estos métodos suelen requerir equipamiento especializado, tiempos prolongados de incubación y protocolos complejos que dificultan su implementación como pruebas rápidas o de fácil interpretación visual.

En consecuencia, persiste la necesidad de desarrollar métodos alternativos que permitan la detección rápida y sencilla de biomarcadores de daño renal urinario, con adecuada especificidad y sensibilidad, y que puedan ser ejecutados mediante procedimientos simplificados.

RU2670908

MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEFROPATÍA

La invención encontrada comprende un método para el diagnóstico de la nefropatía, una serie de análisis que permiten diagnosticar trastornos en el flujo de sangre renal en etapa preclínica para los casos de nefropatía hipertensiva

El documento describe un enfoque basado en técnicas de análisis molecular y kits de diagnóstico, sin contemplar el uso de anticuerpos IgY nanoconjugados ni mecanismos de detección colorimétrica visual.

WO9744663

MÉTODO DE EXAMINACIÓN Y KIT DE EXAMINACIÓN PARA NEFROPATÍA POR IgA

La invención se refiere a un método para el examen de nefropatía por IgA sin necesidad de realizar una biopsia como procedimiento esencial en métodos convencionales. Se trata de un método que utiliza técnicas de análisis molecular. La solución incluye un kit para la realización del análisis.

Difiere de la solución que se pretende proteger en tanto esta última usa anticuerpos nanoconjugados como componente y método totalmente distintos en el pronóstico temprano de afectaciones renales.

Breve descripción de la invención

La solución planteada propone la utilización de nanopartículas metálicas (oro o sulfuro de cadmio) funcionalizadas con uno o más anticuerpos IgY específicos (anti-osteopontina, anti-NGAL, anti-nefrina y/o anti-cistatina C), para la detección en orina de biomarcadores asociados al daño renal, mediante un cambio de coloración observable derivado de la interacción antígeno–anticuerpo en la plataforma nanopartícula–anticuerpo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Diagrama de flujo del proceso

Descripción detallada de la invención

La utilización de plataformas basadas en nanomateriales en conjunto con anticuerpos IgY en pruebas rápidas de fácil uso para la detección temprana en diversas patologías, ha generado un alto interés en sus desarrollos, cuya aplicación brinda una herramienta de orientación en la toma de decisiones con respecto a las guías de tratamiento a seguir.

En ese orden, entre las aplicaciones comprendidas está destinada a facilitar la identificación de ciertas enfermedades. Entre ellas las enfermedades renales que en sus etapas tempranas son silenciosas y asintomáticas lo cual es un inconveniente para su diagnóstico y pronto tratamiento.

Este inconveniente puede ser superado mediante el desarrollo de pruebas rápidas para la detección temprana basada en conjugados de nanopartículas metálicas con anticuerpos IgY (uno o más anticuerpos) dirigidos contra biomarcadores urinarios tempranos de daño renal, esto permitirá la detección en muestras de orina, proporcionando una detección temprana en fases iniciales de la enfermedad renal.

La presente invención se refiere a un método para la detección de biomarcadores de daño renal urinario basado en el uso de anticuerpos IgY nanoconjugados, que permite identificar la presencia de dichos biomarcadores mediante un cambio de coloración observable.

En una realización preferida, los anticuerpos IgY se obtienen a partir de huevos de gallina inmunizada con un antígeno correspondiente a un biomarcador de daño renal seleccionado entre lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), osteopontina, cistatina C o nefrina. Los anticuerpos IgY son posteriormente purificados mediante técnicas convencionales, tales como precipitación selectiva, cromatografía o filtración.

Una vez purificados, los anticuerpos IgY son evaluados para confirmar su especificidad antigénica frente al biomarcador correspondiente mediante ensayos inmunológicos conocidos por la persona experta en la materia.

Posteriormente, los anticuerpos IgY purificados se conjugan con nanopartículas, preferiblemente nanopartículas de oro coloidal o de sulfuro de cadmio, mediante adsorción física o mediante enlaces covalentes activados químicamente.

Para la detección, una solución que comprende los anticuerpos IgY nanoconjugados se pone en contacto con una muestra de orina, se somete a agitación mecánica y se deja reaccionar durante un tiempo predeterminado. La interacción entre el biomarcador presente

en la muestra y los anticuerpos IgY nanoconjugados produce un cambio de coloración, el cual indica la presencia del biomarcador de daño renal urinario.

La plataforma nanopartícula-anticuerpos IgY, ofrece una oportunidad para su aplicación en nefropatías para la detección temprana del daño renal en sus etapas iniciales, dando una herramienta en la toma de decisiones en la ruta a seguir en el tratamiento del paciente.

Los nanoconjugados (nanopartículas metálicas- anticuerpos IgY) obtenidos, comprenden ciertas características que le brindan aspectos idóneos para ser usados en el diagnóstico de daño renal, gracias al tamaño y forma de los nanoconjugados, los cuales presentan diámetros comprendidos entre 20 y 100 nm y pueden contener uno o más anticuerpos IgY, lo que les brinda la capacidad de reconocer biomarcadores urinarios de daño renal temprano. Así, el daño puede ser detectado visualmente mediante el cambio de color gracias a las propiedades fotofísicas de las nanopartículas metálicas.

La obtención de la prueba de detección por medio de nanoconjugados se desarrolla a través de varias etapas.

Lo primero es la producción de anticuerpos IgY, los cuales se obtienen con la inmunización de gallinas ponedoras High Light Brow de aproximadamente 16 semanas de edad, con proteínas recombinantes osteopontina, nefrina, NGAL, cistatina C, todas obtenidas de abcam. Los huevos colectados pre-inmunizados y post-inmunizados se almacenaron a 4°C hasta extracción de los anticuerpos IgY.

La extracción de los anticuerpos IgY, comienza con la separación de la yema del albumen mediante método físico, retirando los residuos de albumen con una servilleta absorbente. Para remoción de lípidos se emplea método PBS:Cloroformo proporción 1:2, con un periodo de incubación de 2 horas y centrifugación por 30 minutos a 2000 g a 4°C, almacenando el sobrenadante a -80°C. Los valores de proteínas en los extractos totales se cuantifican mediante patrón estándar una curva de calibración con albumina sérica bovina a 280 nm.

La reactividad de los anticuerpos IgY fue evaluada mediante ensayos ELISA convencionales usando como antígenos las proteínas recombinates. La purificación de los extractos de anticuerpos IgY se realiza mediante cromatografía de afinidad.

La segunda etapa, es la elaboración de nanopartículas metálicas, para la obtención de nanopartículas de oro, se sintetizan mediante reducción química fragmentos de AuCl₃ usando citrato de sodio en una relación de 2.5, con agitación constante y suministro de calor

por 30 minutos. El cambio de color de la solución evidencia la formación de partículas de oro coloidal mono-dispersas. Éstas se caracterizan están midiendo su tamaño de partícula y su absorbancia en el espectro Uv-vis entre las longitudes de onda de 350 800 nm.

Por otra parte, las nanopartículas de sulfuro de cadmio se obtienen mediante la realización de mezclas de soluciones estequiométricas de sulfato de cadmio (CdSO_4) y tiourea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) en una proporción molar de 1:1.6. Esta proporción es modificable, de tal manera que, aumentando la proporción, disminuye el tamaño de la nanopartícula y viceversa.

Esta mezcla es sometida a radiación térmica generada por microondas, hasta obtener un cambio intenso en el color de la solución. Esta solución se deja en reposo por 24 horas protegida de la luz, transcurrido este tiempo se centrifuga, se desecha el sobrenadante y el precipitado se redispone en un $\frac{1}{4}$ del volumen inicial.

La tercera etapa corresponde a la funcionalización de las nanopartículas de oro o sulfuro de cadmio con los anticuerpos IgY anti osteopontina, anti nefrina, anti cistatina C y anti NGAL. Para la funcionalización de nanopartículas de oro con un solo anticuerpo IgY, se toman 2 mL de solución de AuNPs, se centrifugan a 6.000 rpm durante 5 minutos, se reconstituye el pellet con 1 mL solución de extracto con anticuerpo IgY, se centrifuga a 6.000 rpm por 5 minutos se almacena el pellet que contiene las nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo IgY. Para la funcionalización de nanopartículas de oro con dos o más anticuerpos IgY, se toman 2 mL de solución de AuNPs, se centrifugan a 6.000 rpm por 5 minutos se reconstituye el pellet con 0.5 o 0.3 mL solución de cada extracto con anticuerpo IgY, se almacena la solución que contiene las nanopartículas funcionalizadas con los anticuerpos IgY.

Para la funcionalización de las nanopartículas sulfuro de cadmio, el resultado se obtiene mezclando solución de puntos cuánticos con extracto de anticuerpo IgY en proporción estequiométrica de 2:1, esta mezcla se centrifuga a 6.000 rpm por 5 minutos. El pellet se reconstituye con 1 mL de PBS, y se almacena la solución que contiene las nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo IgY.

Para la funcionalización de varios anticuerpos con las nanopartículas de sulfuro de cadmio, se mezclan en proporciones 1:1 de cada anticuerpo y esta solución se mezcla con las nanopartículas de sulfuro de cadmio en una relación 2:1.

Las nanopartículas de sulfuro de cadmio obtenidos están constituidas por un núcleo cristalino de sulfuro de cadmio (CdS) y una capa de uno o más anticuerpos IgY.

Los conjugados de nanopartículas de oro con anticuerpos IgY, están constituido por un núcleo coloidal de átomos de oro y una capa de uno o más anticuerpos IgY. Las nanopartículas de oro o sulfuro de cadmio funcionalizadas con anticuerpos IgY actúan como agentes de detección para biomarcadores urinarios de daño renal.

En una realización ejemplar, se emplea 1 mL de una solución de anticuerpos IgY conjugados con nanopartículas de oro coloidal, la cual se mezcla con 100 mL de una muestra de orina. La mezcla se agita mecánicamente y se deja reaccionar durante aproximadamente cinco minutos. La aparición de una coloración visible indica la presencia del biomarcador de daño renal correspondiente.