

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo
con los datos que figuran en la pre-
sente descripción y según el con-
tenido de la Memoria adjunta.

(RAN 4093/23)

PATENTE DE INVENCION

ES

11

21

22

NUMERO

FECHA DE PRESENTACION

407667

A1

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
2946/77	9 Marzo 1.977	Suiza
37 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G O I N	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"UN METODO PARA LA DETERMINACION DE PEROXIDASA EN UNA MUESTRA FISIOLÓGICA"		
71 SOLICITANTE (ES)		
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
BASILEA (Suiza)		
72 INVENTOR (ES)		
Harald Gallati		
73 TITULAR (ES)		
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A.		
74 REPRESENTANTE		
D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial.		

POOR
QUALITY

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a un método para la determinación de peroxidasa, que es de particular importancia en conexión con pruebas inmunológicas por enzimas

5. en donde esta enzima se utiliza para la marcación de antígenos o anticuerpos.

Para la determinación inmunológica por enzimas de constituyentes en fluidos fisiológicos, en tejidos o en extractos celulares y extractos de tejido, se marcan

10. con enzimas antígenos o anticuerpos. En calidad de enzima marcadora se ha utilizado hasta ahora, en la mayor parte, peroxidasa de rábanos. Esta enzima es obtenible fácilmente con elevada pureza, tiene una elevada actividad específica, es resistente frente a la mayor parte de los

15. reactivos de copulación químicos, posee una buena estabilidad al almacenamiento y puede separarse fácilmente de la peroxidasa enlazada al antígeno o al anticuerpo según una molécula proteínica relativamente reducida (peso molecular = 40000).

20. Para determinar la actividad de la peroxidasa se ha utilizado hasta ahora, fundamentalmente, o-dianisidina, o-toluidina, guayacol y 2,6-diclorofenolindofenol. Estos cromóforos son, por lo general, poco solubles y, por consiguiente, pueden utilizarse en la prueba solo en bajas

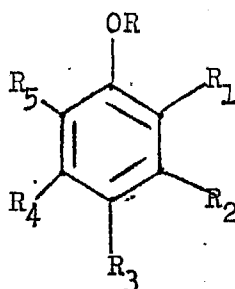
25. concentraciones. Además, no son aptos para proteger de forma efectiva la peroxidasa antes de la inactivación por peróxido de hidrógeno. En diversas investigaciones se ha demostrado que la peroxidasa en circulación durante la reacción catalítica forma un complejo estable y enzimático.

- camente inactivo con peróxido de hidrógeno, de modo que siempre se encuentra presente menos peroxidasa en forma activa. Esto tiene la consecuencia de que después de una reacción de 10 a 20 minutos de duración a una temperatura de incubación de 37°C, resulta completamente inactiva la peroxidasa. Esta desactivación es especialmente desventajosa en el caso de pruebas inmunológicas por enzima, debido a que los constituyentes que han de determinarse se encuentran presentes con frecuencia en concentraciones tan bajas que, para obtener una sensibilidad suficiente, la peroxidasa enlazada al antígeno o anticuerpo debe incubarse durante hasta 2 horas con la solución de sustrato-tampón correspondiente.

- El presente invento proporciona ahora un método que no adolece de los inconvenientes antes citados. Este invento permite determinar cuantitativamente pequeñas cantidades de peroxidasa y al propio tiempo facilita obtener una sensibilidad esencial para las pruebas inmunológicas por enzima.

- Más concretamente el presente invento se refiere a un método para la determinación de peroxidasa en una muestra, cuyo método comprende mezclar la muestra con un tampón que proporcione un valor pH de 3 a 10,5, con un sustrato para la peroxidasa, con una mezcla de uno o más compuestos de la fórmula general





(I)

5.

en donde

R representa un átomo de hidrógeno o de metal alcalino

10 R_1, R_2, R_3, R_4 y R_5 representan, cada uno, un átomo de hidrógeno, bromo o cloro o un grupo nitro, de alquilo inferior o carboxílico,

15 y con 4-aminoantipirina, incubar la mezcla resultante a una temperatura comprendida entre 10°C y 60°C y determinar el contenido de peroxidasa presente en la muestra midiendo el aumento de la intensidad de color resultante por intervalo de tiempo.

20 En el método proporcionado por el presente invento puede investigarse directamente con respecto al contenido de peroxidasa la muestra analítica (por ejemplo, un fluido fisiológico o un extracto celular).

25 Sin embargo, ventajosamente, el método proporcionado por el presente invento se utiliza para determinar la actividad de la peroxidasa como parte de pruebas inmunológicas por enzimas tal como se describe en, por ejemplo, Clin. Chem. 22, 733-738 (1976) o en Clin. Chem. 22, 1243-1255 (1976). En este caso la muestra investigada en la parte enzimática de la prueba inmunológica por enzima contiene la peroxidasa en una forma enlazada a un material inmunológicamente activo (antígeno o anticuerpo).

La expresión "material inmunológicamente activo" aquí utilizada incluye todos los constituyentes de los fluidos fisiológicos, tejidos, extractos celulares y extractos de tejido para los que está presente o puede

5. formarse un alelo de reacción inmunológica. A éste pertenecen las aminas primarias, aminoácidos, péptidos, proteínas, glicoproteínas, esteroides, esteroides, lipoides, ácidos nucleicos, enzimas, hormonas, vitaminas, polisacáridos y alcaloides.
10. Los materiales inmunológicamente activos especialmente preferidos son coriongonadotropina humana, factor reumatoide, toxoplasma, Candida, Trypanosoma, CEA antígeno y mioglobina.

- Un sistema tampón con el que puede obtenerse
15. un valor pH entre 3 y 10,5, de preferencia entre 6 y 9, es apropiado para los fines del presente invento. Muy especialmente se prefiere un sistema tampón con el que pueda obtenerse un valor pH entre 6,5 y 7,5.

- Los sistemas de tampón apropiados son, por ejemplo,
20. tampón de fosfato, tris-tampón y tampón borato. La concentración del tampón no es crítica, pero está comprendida, de preferencia entre 50 y 200 mmol/l.

- El peróxido de hidrógeno sirve como el sustrato para la peroxidasa. El peróxido de hidrógeno puede utilizarse
25. tal cual o puede formarse durante la reacción con la ayuda de sistemas enzimáticos apropiados. Estos sistemas enzimáticos son, por ejemplo, glucosa-oxidasa/glucosa o uricasa/ácido úrico.

Cuando se utiliza el propio peróxido de hidrógeno

se elige una concentración de 0,05 a 10 mmol/l, de preferencia 0,2 a 1 mmol/l.

El compuesto de la fórmula I anterior forma, junto con 4-aminoantipirina bajo la acción de peróxido de hidrógeno y peroxidasa, una sustancia coloreada cuya velocidad de formación es directamente proporcional a la cantidad de peroxidasa presente, la cual puede determinarse midiendo la intensidad de color resultante bajo condiciones de prueba definidas.

10. Los compuestos de la fórmula I apropiados son fenol, o-clorofenol, m-clorofenol, p-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,5-diclorofenol, 3,4-diclorofenol, 2,4-dibromofenol, o-nitrofenol, m-nitrofenol, p-nitrofenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, 2,4-dimetilfenol, 2,4-dinitrofenol y ácido 4-hidroxi-benzoico. Especialmente se prefiere el fenol.

La concentración del compuesto de la fórmula I se encuentra, ventajosamente, entre 1 y 200 mmol/l, prefiriéndose especialmente una concentración de 10 a 50 mmol/l.

20. La concentración de 4-aminoantipirina está comprendida, de preferencia, entre 0,1 y 10 mmol/l, prefiriéndose especialmente una concentración de 1 a 3 mmol/l.

25. La secuencia con que se adicionan los reactivos antes citados se elige de modo que, para completar el sistema, se adicione finalmente la peroxidasa en forma de la muestra o el sustrato para la peroxidasa.

La temperatura con que se lleva a cabo la incubación es crítica. La temperatura puede estar comprendida entre 10°C y 60°C, de preferencia entre 25°C y 40°C, y debe mantenerse constante durante toda la duración de

la incubación. El tiempo de incubación en el caso de una temperatura de incubación dada depende del contenido de peroxidasa en la muestra. En el caso de pruebas inmunológicas por enzima el tiempo de incubación se encuentra

5. entre 1 minuto y 4 horas, de preferencia entre 30 minutos y 120 minutos.

El contenido de peroxidasa presente en la muestra se determina midiendo la intensidad de color resultante en la reacción enzimática bajo condiciones de prueba

10. definidas (concentración de los reactivos, valor pH, temperatura, duración de la incubación). Se mide una diferencia de extinción, correspondiendo esta diferencia al aumento de la intensidad de color con la cantidad de peroxidasa presente, siendo por tanto directamente propor-

15. cional.

La medición de la intensidad de color se lleva a cabo, ventajosamente, fotométricamente en una longitud de onda comprendida entre 450 nm y 580 nm.

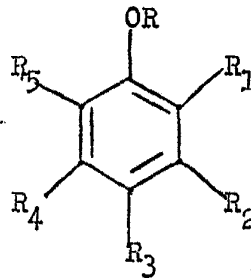
El método proporcionado por el presente invento

20. es apropiado no solo para las determinaciones manuales de peroxidasa sino también para determinaciones automáticas.

Los reactivos requeridos para llevar a cabo el método proporcionado por el presente invento se envasan, de preferencia, en un paquete de reactivo. Un paquete

25. de reactivo apropiado para los fines del presente invento contiene, ventajosamente, en diversos contenedores

(a) uno o mas compuestos de la fórmula general



(I)

5.

en donde

R representa un átomo de hidrógeno o de metal alcalino y R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ representan, cada uno, un átomo de hidrógeno, bromo o cloro o un grupo nitro, alquílico inferior o carboxílico,

10.

(b) 4-aminoantipirina

y, si se desea,

(c) un tampón que proporcione un valor pH de 3 a 10,5 y también, si se desea,

15.

(a) un sustrato para la peroxidasa.

El paquete de reactivo puede contener también un recipiente con una solución testigo o solución estándar y/o un recipiente con un reactivo para concluir la reacción y/o reactivos para llevar a cabo una determinación inmunológica.

20.

Sin embargo no es necesario almacenar todos los reactivos en contenedores separados. El presente invento incluye también un paquete de reactivo en donde se almacenan juntos, en el mismo contenedor, varios de los reactivos requeridos para llevar a cabo el método proporcionado por el invento.

25.

Así pues, por ejemplo, el tampón puede almacenarse junto con 4-aminoantipirina en un solo contenedor.

Los diversos reactivos pueden envasarse no solo en forma líquida sino también en forma sólida.

Los ejemplos que siguen ilustran el presente invento.

5. EJEMPLO 1.

Se disuelve una cantidad pesada con exactitud de peroxidasa de rábano de elevada pureza en 0,1 mol/l de tampón de hidrofosfato disódico y a partir de la solución resultante se preparan diversas diluciones. Para determinar la actividad de estas soluciones de peroxidasa se mezcla 2,0 cc de solución de prueba (0,1 mol/l de tampón de fosfato de pH 7,25 con 25 mmol/l de fenol, 2 mmol/l de 4-aminoantipirina y 0,8 mmol/l de peróxido de hidrógeno) con 0,05 cc de la muestra y la diferencia de extinción se determina a 37°C cada 30 minutos a una longitud de onda de 492 nm.

20.

25.

Contenido de peroxidasa en la muestra	$E_{492 \text{ nm}/30 \text{ min.}/37^\circ\text{C}}$
0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,940
0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,465
0,05 $\mu\text{g/ml}$	0,240
0,025 $\mu\text{g/ml}$	0,115
0,0125 $\mu\text{g/ml}$	0,058
0,00625 $\mu\text{g/ml}$	0,030
0 $\mu\text{g/ml}$	0,002

A partir de los valores de medición que preceden se prepara una curva estándar.

Se repite el método anterior con las muestras

desconocidas y los valores de medición de este modo obtenidos se comparan con la curva estándar de peroxidasa para determinar el contenido de peroxidasa.

EJEMPLO 2.

5. Para determinar el contenido de CEA, se incuban muestras con antisuero CEA canino a la temperatura del ambiente durante 24 horas en un tampón de borato de pH 8,4. A continuación se adiciona a esta mezcla una cantidad determinada de peroxidasa de rábano CEA de marca (POD) y se incuba la mezcla obtenida a la temperatura del ambiente y en la obscuridad durante 16 horas.

10. Se adiciona ahora la solución resultante a inmunoglobulina de cabra anti-canina que se enlaza a un cuerpo sólido. Después de 30 minutos se separa la fase sólida de la fase líquida y se determina la actividad de peroxidasa en la solución sobrenadante como sigue:

15. Se mezcla 1,0 cc de solución de prueba (0,2 mmol/l de tampón fosfato de pH 7,25 con 50 mmol/l de fenol, 4 mmol/l de 4-aminoantipirina y 1,6 mmol/l de peróxido de hidrógeno) con 1,0 cc de solución sobrenadante. A continuación se determina fotométricamente a 492 nm la diferencia de extinción por unidad de tiempo a 37°C.

20. El contenido de CEA en la muestra se calcula utilizando una curva estándar de CEA que se prepara después de llevar a cabo el método anterior con soluciones estándar de contenido de CEA apropiado.

= . =

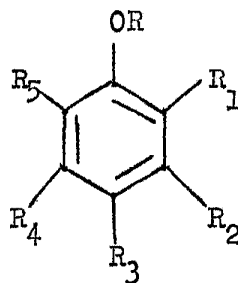
REIVINDICACIONES

Descripto el objeto del presente invento se decla-

ran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones.

1. Un método para la determinación de peroxidasa en una muestra, fisiológica cuyo método comprende mezclar la muestra, en un tampón que proporcione un valor pH de 3 a 10,5, con un sustrato para la peroxidasa, con una mezcla de uno o mas compuestos de la fórmula general

10.



(I)

en donde

15. R representa un átomo de hidrógeno o de metal alcalino y R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ representan, cada uno, un átomo de hidrógeno, bromo o cloro o un grupo nitro, alquílico inferior o carboxílico,
20. y con 4-aminoantipiridina, incubar la mezcla resultante a una temperatura comprendida entre 10°C y 60°C y determinar el contenido de peroxidasa presente en la muestra midiendo el aumento de intensidad de color por intervalo de tiempo.
25. 2. Un método, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el valor pH está preferentemente comprendido entre 6,5 y 7,5.
3. Un método, de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la concentración de tampón

está comprendida entre 50 y 200 mmol/l.

4. Un método, de conformidad con la reivindicación 1, 2 o 3, caracterizado porque el tampón es un tampón de fosfato.

5. 5. Un método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 inclusivos, caracterizado porque el sustrato para la peroxidasa es peróxido de hidrógeno.

10. 6. Un método, de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque la concentración de peróxido de hidrógeno está comprendida entre 0,05 y 10 mmol/l.

15. 7. Un método, de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la concentración de peróxido de hidrógeno está preferentemente comprendida entre 0,2 y 1 mmol/l.

8. Un método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 inclusivos, caracterizado porque la concentración de compuestos de la fórmula I está comprendida entre 1 y 200 mmol/l.

20. 9. Un método, de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque la concentración de compuestos de la fórmula I está preferentemente comprendida entre 10 y 50 mmol/l.

25. 10. Un método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, inclusivo, caracterizado porque se utiliza fenol en calidad del compuesto de la fórmula I.

11. Un método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, inclusivo, caracterizado

porque la concentración de 4-aminoantipirina está comprendida entre 0,1 y 10 mmol/l.

5. 12. Un método, de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la concentración de 4-aminoantipirina está preferentemente comprendida entre 1 y 3 mmol/l.

10. 13. Un método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, inclusive, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 25°C y 40°C.

14. Un método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 inclusive, caracterizado porque la peroxidasa que ha de determinarse se enlaza a un material inmunológicamente activo.

15. 15. Un método, de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el material inmunológicamente activo es el antígeno CEA.

16. Un método, para la determinación de peroxidasa en una muestra fisiológica.

20. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 14 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

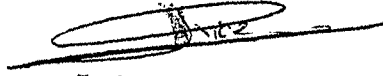
467667

Madrid, a

p. a.

JAIME ISERN

P. P.



Firmado: JESUS PICAZO