



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 245 587**

② Número de solicitud: 200400594

⑤ Int. Cl.7: **C12Q 1/28**

C12Q 1/42

C12Q 1/44

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **05.03.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2006**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.01.2006

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Oviedo**
Plaza del Riego, 4
Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES

⑱ Inventor/es: **Costa García, Agustín;**
González García, María Begoña y
Fanjul Bolado, Pablo

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Método analítico para la medida de la actividad enzimática basado en la detección de leucoíndigo.**

㉖ Resumen:

Método analítico para la medida de la actividad enzimática basado en la detección de leucoíndigo.

Método analítico para la medida de la actividad enzimática basado en la detección de leucoíndigo, para la cuantificación de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres indoxílicos, como el 3-indoxil fosfato, generando azul de índigo o algún otro derivado suyo como producto. Los enzimas que intervienen en estos ensayos son del tipo de la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa de rábano silvestre (HRP), comúnmente utilizados como marcas en inmunoensayos o en reacciones de hibridación de ADN.

La metodología descrita se basa en la determinación del azul de índigo a través de su solubilización en medio básico y en presencia de un agente reductor. De este modo se genera leucoíndigo, especie detectable por técnicas con fundamento electroquímico u óptico-espectroscópico. De aplicación al sector de los análisis clínicos.

ES 2 245 587 A1

DESCRIPCIÓN

Método analítico para la medida de la actividad enzimática basado en la detección de leucoíndigo.

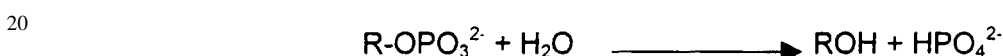
5 El método objeto de la presente invención resulta de aplicación a ensayos de afinidad, principalmente en el sector de los análisis clínicos.

Antecedentes de la invención

10 La detección sensible de sustancias de tipo biológico haciendo uso de ensayos de afinidad, tales como inmunoensayos o hibridación de ADN, es muy importante en diferentes áreas: química clínica, microbiología, genética etc.

15 Para desarrollar ensayos con una alta sensibilidad es necesario emplear reactivos marcados, generalmente con enzimas. Aunque un gran número de enzimas han sido empleadas como "marcas", sin duda alguna, las más utilizadas son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano silvestre.

La fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) es una fosfohidrolasa que cataliza la ruptura de enlaces monofosfóricos para generar fosfato inorgánico y el correspondiente alcohol, según el siguiente esquema de reacción:



25 Este enzima presenta un peso molecular aproximado de 140 kDa, contiene al menos dos átomos de zinc por molécula y la presencia de magnesio es considerada esencial para una actividad máxima. La principal fuente de obtención del enzima es el intestino de ternero que resulta muy adecuado ya que puede ser modificado fácilmente sin pérdidas apreciables de actividad.

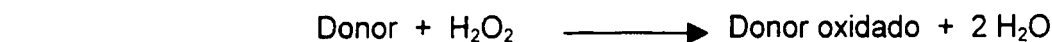
30 La fosfatasa alcalina se desnaturaliza lentamente a 37°C y presenta una actividad óptima a pH comprendido entre 9-10. Agentes quelantes del Zn y el Mg como el AEDT actúan como inhibidores, al igual que el fosfato inorgánico. Las disoluciones reguladoras más empleadas con éste enzima son determinados aminoalcoholes como la dietanolamina, el 2-amino-1-propanol, tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) y otros (M.P.Kreuzer, C.K. O'Sullivan, G.G.Guibault, *Anal.Chim.Acta*, 1999, 393, 95). De todos ellos, el Tris es uno de los más usados. Estas disoluciones reguladoras no sólo fijan el pH sino que favorecen la reacción enzimática. ya que son capaces de aceptar grupos fosfato.

35 Como marca en ensayos de afinidad la fosfatasa alcalina presenta la ventaja de que mantiene constante su actividad catalítica durante elevados periodos de tiempo. Los límites de detección pueden ser mejorados, por tanto, con un simple aumento del tiempo de reacción.

40 Los reactivos inmunológicos conjugados con HRP presentan una ventaja principal sobre aquellos que están marcados con AP, ya que el enzima mantiene una mayor actividad específica. Además, una elevada estabilidad y bajo coste hacen de la HRP el enzima elegido en la mayoría de estas aplicaciones.

45 Las peroxidasas son un grupo de enzimas que catalizan reacciones de reducción-oxidación, siendo por ello clasificadas como oxidorreductasas. Dentro del amplio grupo de las peroxidasas se encuentra la peroxidasa de rábano silvestre (EC 1.11.1.7) (R.Huang, N.Hu, *Bioelectrochemistry*, 2001, 54, 75), glicoproteína que contiene un grupo hemo en su centro activo y que presenta un peso molecular aproximado de 44kDa (C.P.Price, D.J.Newman, *Principles and Practice of Immunoassay*, Stockton Press, New York, 1991).

50 En su modo general de actuación, las peroxidasas reducen peróxido de hidrógeno a agua mientras oxidan una gran variedad de sustratos. Son, por tanto, oxidorreductasas que utilizan el peróxido de hidrógeno como aceptor electrónico para catalizar reacciones de oxidación. El esquema general de reacción queda del siguiente modo:



La especificidad del enzima por la especie denominada *donor* es bastante baja, por lo que existe una gran variedad de compuestos que pueden desempeñar tal papel.

60 Continuamente se encuentran en la bibliografía nuevos sustratos para la HRP, siendo uno de los más recientes el TPPN (5,10,15,20-tetrahydro-tetraphenylporphyrinogen) (A. Manaka, M.Sakai, S.Igarashi, *Anal.Chim.Acta*, 2003, 478, 37). Éste, se ha propuesto como un sustrato espectrofotométrico.

65 El más comúnmente utilizado es el TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) del que existen varias formulaciones comerciales. El producto que se genera es detectado ópticamente a 450 nm después de detener la reacción con ácido sulfúrico diluido. Otros sustratos comúnmente utilizados en inmunoensayos que emplean como marca a la HRP son o-dianisidina (ODA), 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de diamonio (ABTS), y 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

El 3-indoxil fosfato, ha sido propuesto como el primer sustrato válido para la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano silvestre. Se genera como producto un heterociclo aromático insoluble en medio acuoso denominado azul de índigo. Este se solubiliza para su cuantificación, a través de la adición de ácido sulfúrico concentrado. Se genera, por tanto, un derivado suyo soluble en disolución acuosa, denominado índigo carmín. Esta vía de solubilización es la más empleada en ELISAS que utilizan 3-indoxil fosfato como sustrato, sin embargo, el uso de ácido sulfúrico concentrado no está recomendado en laboratorios de análisis de rutina. Para eliminar este reactivo se puede hacer uso de un procedimiento ampliamente extendido en la industria textil.

Desde la coloración de vestimentas en el antiguo Egipto hasta los vaqueros Levi's, el índigo ha servido para teñir tejidos de azul durante 3000 años. El índigo es insoluble en disoluciones acuosas pero su forma reducida es soluble en medio básico. Así, en el proceso de tinción, las fibras se ponen en contacto y se impregnan de esta especie reducida exponiéndose después al aire libre. De esta forma la especie reducida se reoxida y queda sobre la fibra la tintura azul original. La reacción básica del proceso se muestra en la figura 1.

La reducción del índigo tiene lugar en medio básico y en presencia de un agente químico fuertemente reductor, siendo el más empleado el ditionito sódico. Sin embargo, otras alternativas están siendo estudiadas como las sales de hierro (II), agentes reductores orgánicos de la familia de las α -hidroxicetonas, el uso de un baño de ultrasonidos en el proceso de solubilización o una reducción electroquímica directa en ausencia de agentes químicos (A. Roessler, O. Dossenbach, U. Meyer, W. Marte, P. Rys, *Electrochimica Acta*, 2002, 47, 1989).

Hasta este momento la mención del leucoíndigo ha ido casi exclusivamente ligada a la industria textil; sin embargo también puede ir unido al de ensayos que impliquen la medida de la actividad enzimática en análisis clínicos, ambientales etc.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la reducción directa de índigo en medio básico y en presencia de ditionito sódico.

La figura 2 representa el espectro de excitación y emisión de la fluorescencia para el leucoíndigo.

Descripción de la invención

La presente invención supone el empleo de un agente reductor en medio básico para la solubilización de azul de índigo o de alguno de sus derivados, característicos por su insolubilidad en medio acuoso. De este modo se genera leucoíndigo y a través de su cuantificación se realiza la medida de la actividad de un enzima. Este enzima puede estar libre en disolución o actuando como agente de marcaje de reactivos inmunológicos, hebras de ADN o cualquier otro reactivo que intervenga en ensayos de afinidad.

El azul de índigo se produce a través de una reacción enzimática donde el enzima pertenece al grupo de las fosfatasas, peroxidases, beta-D-galactosidasas, esterasas, sulfatasas, beta-D-glucosidasas y beta-D-g lucoronidasas.

Como sustrato de la reacción enzimática se utiliza cualquier éster indoxílico que presente un grupo: fosfato, acetato, sulfato, glucoronato, galactopiranosido, glucopiranosido, fructopiranosido o manopiranosido.

La presente invención emplea ditionito sódico como agente reductor, sin embargo, sales de hierro (II), hidroxicetonas, borohidruro de sodio u otros reductores se pueden utilizar como reactivos para la generación de leucoíndigo.

El leucoíndigo puede ser detectado con técnicas con fundamento electroquímico u óptico-espectroscópico. Esta vía de solubilización del azul de índigo generado enzimáticamente es útil para el revelado de ensayos de afinidad como ELISAS.

Ejemplo de realización de la invención

La eficacia del procedimiento se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo que no pretende ser limitativo de su alcance. Este ejemplo muestra el empleo de una disolución básica de ditionito sódico para reducir azul de índigo (generado enzimáticamente) a leucoíndigo y de este modo cuantificar peroxidasa o fosfatasa alcalina presentes en disolución. El sustrato empleado en este caso es el 3-indoxil fosfato y el sistema de detección electroquímico y espectrofotométrico.

Las reacciones enzimáticas fueron llevadas a cabo en placas de pocillos ELISA según el siguiente procedimiento:

- *Bloqueo de la superficie del pocillo con albúmina.* Se añaden a cada uno de los pocillos 200 μ L de una disolución reguladora PBS 10 mM de pH 7,4 - 8 g/L de NaCl - 2 g/L de KCl - 3% de albúmina (BSA) y se deja descansar toda la noche a 4°C. De este modo se evita la posible adsorción del enzima al pocillo asegurándose que todos los centros activos del mismo estén disponibles.

- *Etapa de lavado.* Los pocillos se vacían de su contenido y se lavan 3-4 veces con una disolución reguladora correspondiente al mismo medio en el que se trabajará la siguiente etapa.

ES 2 245 587 A1

5 - *Desarrollo de la reacción enzimática.* Se adicionan sobre los pocillos los reactivos necesarios para que tenga lugar la reacción. El sustrato común es el 3-indoxil fosfato tanto para la AP, como para la HRP, siendo necesaria la presencia de H_2O_2 con este último enzima. La principal diferencia en la reacción enzimática será únicamente el pH del medio. La reacción se lleva a cabo, en presencia de una cierta cantidad de albúmina y en estufa termostata a $37^\circ C$. Durante toda esta etapa se mantiene una ligera agitación.

10 - *Parada de la reacción y formación de leucoíndigo.* Transcurrido el tiempo necesario para que se haya desarrollado la reacción enzimática, ésta se detiene con la adición de $100 \mu l$ de una disolución de NaOH - 4M saturada de ditionito sódico. De este modo, el azul de índigo generado es reducido a leucoíndigo, soluble en medio básico.

10 - *Detección de leucoíndigo.* Esta etapa puede realizarse de modos diferentes en función de la técnica empleada.

15 a) Detección electroquímica: se realiza en un sistema de flujo que lleva acoplado un electrodo de pasta de carbono. Se introducen $50 \mu l$ del contenido del pocillo deseado para llenar el loop. Se cambia la posición de la válvula de inyección y el volumen de muestra mencionado es arrastrado por el flujo portador. Sobre el electrodo, previamente activado, se acumula el leucoíndigo a $-0,2V$ y se registra la señal analítica por voltamperometría de corriente alterna barriendo entre $-0,7V$ y $-0,2V$.

20 b) Detección espectrofotométrica: se utiliza un lector de placas ELISA (midiendo a 405 nm) siendo el procedimiento muy simple. Se introduce la placa en el dispositivo de medida y en unos minutos se obtienen los resultados registrados en papel térmico. Se ha de evitar la presencia de burbujas en disolución y de suciedad en la base de los pocillos.

25 Siguiendo la metodología descrita, se realizaron ensayos para la medida de la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano silvestre y de la fosfatasa alcalina, obteniéndose los siguientes resultados:

30 - En la determinación de HRP se consigue un calibrado lineal entre $8.74 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ y $4.46 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ tanto a través de la detección electroquímica como colorimétrica. La reproducibilidad obtenida en ambos casos, para una concentración de HRP situada en el centro del intervalo lineal es inferior al 5%. La sensibilidad (medida como la pendiente de la recta de calibrado) es mayor en el ensayo realizado con detección voltamperométrica.

35 - En la medida electroquímica de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, se obtiene un intervalo lineal entre $7.69 \cdot 10^{-13} \text{ M}$ y $3.92 \cdot 10^{-11} \text{ M}$ representando I (vs) $\log C$. Realizando el mismo ensayo con detección espectrofotométrica, el intervalo lineal abarca las concentraciones comprendidas entre $3.92 \cdot 10^{-13}$ y $3.92 \cdot 10^{-11} \text{ M}$ representando I (vs) C.

Ventajas de la invención

40 El azul de índigo generado como producto enzimático puede ser detectado directamente a través de su adsorción: sobre el cristal de cuarzo de una microbalanza piezoeléctrica (sensores piezoeléctricos) (J.M. Abad, F. Pariente, L. Hernández, H.D. Abruña, E. Lorenzo, *Anal. Chem*, 1998, 70, 2848) o sobre un electrodo de pasta de carbono (sensores electroquímicos) (C. Fernández-Sánchez, M.B. González-García, A. Costa-García, *Biosens. Bioelectron*, 2000, 14, 917). Sin embargo, la mayoría de las metodologías descritas, para la medida de la actividad enzimática, se basan en su solubilización con ácido sulfúrico concentrado (M. Díaz-González, C.Fernández-Sánchez, A. Costa-García, *Anal. Sciences*, 2002, 18, 1209). El índigo carmín (soluble) formado podrá ser detectado electroquímica (M. Díaz-González, C. Fernández-Sánchez, A. Costa-García, *Anal. Sciences*, 2002, 18, 1209) o espectrofotométricamente (E. L. Roberts, S. Burguieres, I.M. Warner, *Appl. Spectroscopy*, 1998, 52, 1305).

50 La solubilización de azul de índigo con una disolución reductora en medio básico se presenta como una buena alternativa, ya que permite eliminar el ácido sulfúrico concentrado de la metodología de trabajo. Este modo de solubilización permitiría el uso de sustratos como el 3-IP o el BCIP (característicos por generar como producto azul de índigo, insoluble en disoluciones acuosas) en ensayos tipo ELISA que requieren productos solubles.

55 El leucoíndigo generado en disolución es detectado por espectrofotometría de absorción molecular, pero además es fuertemente fluorescente por lo que ensayos más sensibles podrán ser realizados. Este producto permite también una sensible detección electroquímica al adsorberse sobre electrodos de pasta de carbono previamente pretratados. Por presentar un proceso electródico reversible a un bajo potencial, es una especie muy adecuada para llevar a cabo una detección selectiva, por voltamperometría de corriente alterna o voltamperometría cíclica.

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método analítico para la medida de la actividad enzimática basado en la detección de leucoíndigo, **caracterizado** por la reducción en medio básico de azul de índigo o cualquier otro derivado suyo.
2. Un método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la formación de índigo tiene lugar por la acción de un enzima adecuado sobre un éster indoxílico.
- 10 3. Un método, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el éster indoxílico es el 3-indoxil fosfato o el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato.
4. Un método, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el éster indoxílico tiene un grupo fosfato, acetato, sulfato, glucuronato, galactopiranosido, glucopiranosido, fructopiranosido o manopiranosido.
- 15 5. Un método analítico para la medida de la actividad enzimática basado en la detección de leucoíndigo, según la reivindicación 2, donde el enzima empleado es del grupo de las fosfatasas, peroxidasas, beta-D-galactosidasas, estearasas, sulfatasas, beta-D-glucosidasas y beta-D-glucoronidasas.
- 20 6. Un método, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque utiliza como agente reductor una disolución básica de ditionito sódico.
7. Un método analítico para la medida de la actividad enzimática basado en la detección de leucoíndigo, según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque utiliza cualquier técnica de fundamento electroquímico u óptico-espectroscópico en la detección de leucoíndigo.
- 25 8. Un método, según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque utiliza cualquier técnica instrumental para la detección de leucoíndigo o de sus derivados.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURAS

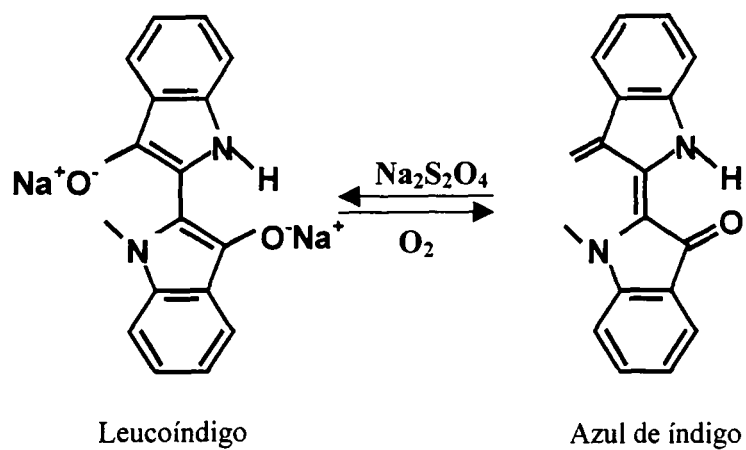


Figura 1

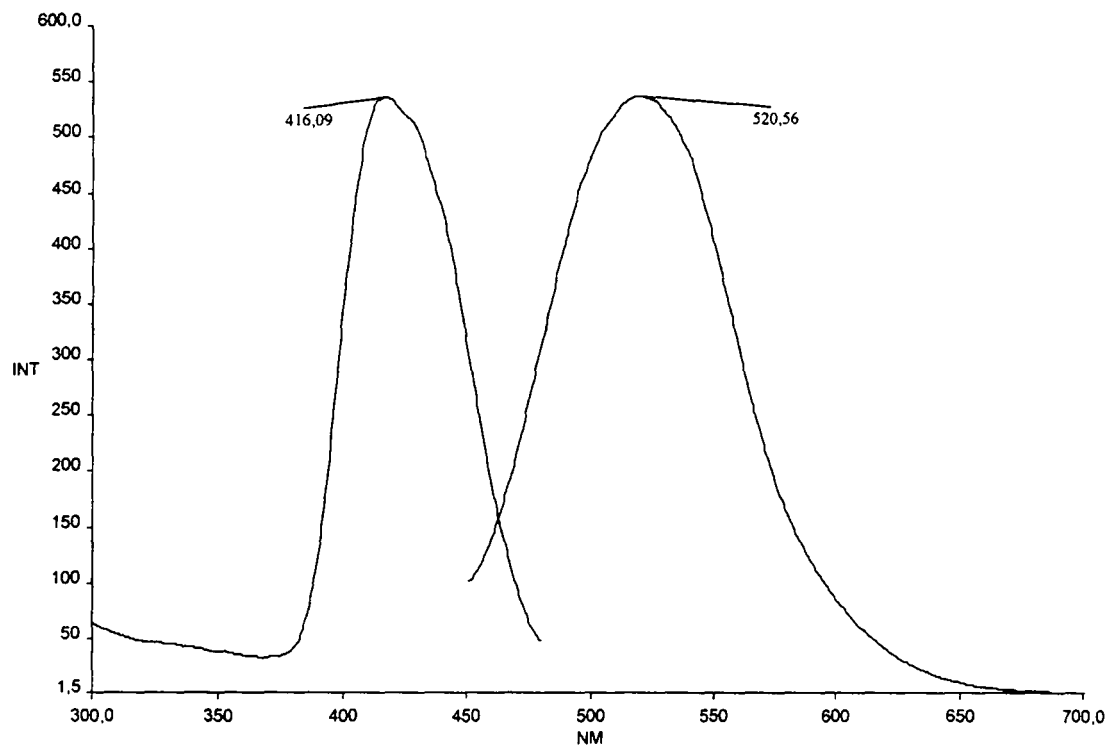


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 245 587

② Nº de solicitud: 200400594

③ Fecha de presentación de la solicitud: **05.03.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12Q 1/28, 1/42, 1/44

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C. et al.: "3-Indoxyl Phosphate: an Alkaline Phosphatase for Enzyme Immunoassays with Voltammetric Detection", Electroanalysis (1998), Vol. 10, nº 4, pp.: 249-255, todo el documento.	1-8
A	EP 0381173 A2 (ABBOT LABORATORIES) 08.08.1990, reivindicación 2.	1-8
A	ANÓNIMO. "Experiment 7. Aldol Condensation: Synthesis of Indigo. Vat Dyeing. online edition for students of organic chemistry lab courses at the University of Colorado, Boulder, Dept. of Chem. and Biochem. (2003) [en línea] [recuperado el 29.11.2005] Recuperado de Internet: <URL:http://orgchem.colorado.edu/courses/3341manual/AldoLMSu03.pdf>	1-8
A	ROESSLER, A. et al.: "Direct Electrochemical Reduction of Indigo", Electrochimica Acta (2002), Vol. 47, pp.: 1989-1995, todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.11.2005

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1