



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 289 927**

⑫ Número de solicitud: 200601269

⑬ Int. Cl.:

C12Q 1/42 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/44 (2006.01)

C07D 209/36 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **17.05.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2008**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.02.2008

⑰ Solicitante/s: **VITRO, S.A.**
Vía de los Poblados
Edificio Indubuilding, 5º - 13
28033 Madrid, ES

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

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Sustrato enzimático que comprende un compuesto indoxílico y una fuente de plata.**

㉑ Resumen:

Sustrato enzimático que comprende un compuesto indoxílico y una fuente de plata.

Sustrato enzimático basado en la combinación de un compuesto indoxílico y una fuente de plata para su uso en la determinación de actividad enzimática. Este sustrato está dirigido a la sensibilización de ensayos enzimáticos, donde el propio enzima sea el analito de interés o donde la actividad enzimática esté relacionada con la concentración del analítico de interés. El enzima actúa inicialmente sobre el compuesto indoxílico generando una nueva especie (indoxilo) que se oxida y dimeriza para formar una molécula de la familia del índigo, en este paso de reacción la oxidación va acompañada de una reducción de iones plata (Ag^+) a plata metálica (Ag^0). El uso de la disolución de plata acelera la formación del producto de la familia del índigo. La formación simultánea de dos productos insolubles, uno de la familia del índigo y otro la plata metálica, es especialmente útil en la sensibilización de ensayos histoquímicos, inmunoensayos y ensayos de hibridación de hebras de ADN.

ES 2 289 927 A1

DESCRIPCIÓN

Sustrato enzimático que comprende un compuesto indoxílico y una fuente de plata.

5 **Campo de la invención**

El objeto de la presente invención es un sustrato enzimático que combina la mezcla de un compuesto indoxílico con una disolución de plata. El sustrato objeto de la presente invención resulta de aplicación en la determinación de actividad enzimática, principalmente en los sectores de análisis clínicos, medioambiental o agroalimentario.

10 **Antecedentes de la invención**

Los sustratos indoxílicos se caracterizan porque al entrar en contacto con un enzima determinado generan un producto coloreado y altamente insoluble en disolución acuosa. Este producto precipitado es estable, no requiere ninguna instrumentación especial para ser detectado y no es un agente carcinógeno ni mutagénico como sucede con alguno de los sustratos comúnmente utilizados en ensayos enzimáticos. Debido a estas características, un gran número de sustratos indoxílicos han sido descritos para la detección de diferentes enzimas. Todos ellos tienen una estructura indólica básica común y un grupo de reconocimiento (fosfato, acetato, beta-D-galactopiranosido, beta-D-glucoronido, butirato, palmitato, etc.) diferente para cada tipo de enzima.

En función de los sustituyentes existentes en la estructura indólica se puede controlar el color del precipitado generado tras la acción del enzima correspondiente. De este modo, el producto final de la familia del índigo puede adoptar diferentes tonalidades: azul, verde, rosa-salmón o púrpura.

Una de las estructuras indoxílicas más utilizadas presenta en su posición 5 un átomo de bromo y en su posición 4 un átomo de cloro como sustituyentes. En este caso concreto, el producto enzimático denominado 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro índigo presenta un color azul oscuro intenso. Basándose en este ejemplo, el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-galactopiranosido (X-Gal) es un sustrato utilizado para la determinación de actividad del enzima beta-galactosidasa, generalmente aplicado para la detección de coliformes en un medio sólido (A. Rambach, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56, 301).

El 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucoronido (X-Glr) ha sido utilizado para la determinación de actividad de beta-D-glucoronidasa, que es útil para la detección de *Escherichia Coli* (G. J. Deslile, A. Ley, *J. Clin. Microbiol.*, 1989, 27, 778).

Otros enzimas del grupo de las esterasas, lipasas, sulfatasas y glicosidasas también han sido detectados por su acción sobre sustratos indoxílicos específicos de cada enzima. Incluso un sustrato indoxílico ha sido sintetizado exclusivamente para la detección del virus de la gripe de tipo A y B, y es la base del kit de diagnóstico de la gripe conocido por su nombre comercial "Zstat Flu Test" (A. Liav, J. A. Hansjergen, K. E. Achyutan, C. D. Shimasaki, *Carbohydr. Research*, 1999, 317, 198).

De este modo se muestra que la familia de los sustratos indoxílicos a los que se refiere la presente invención es ampliamente utilizada y conocida en el mundo de los análisis clínicos, medioambientales, microbiológicos, etc.

Otro grupo de enzimas que son utilizadas con sustratos indoxílicos son las fosfatasa. Se trata de fosfohidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces monofosfóricos para generar fosfato inorgánico y el correspondiente alcohol. De forma general se diferencia entre fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina basándose en el pH al que presentan una actividad óptima: pH 4-5 en el caso de la fosfatasa ácida y pH 9-10 en el caso de la fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina, con un peso molecular aproximado de 140 kDa, contiene dos átomos de zinc por molécula y la presencia de Mg^{2+} es considerada esencial para una actividad máxima. Las disoluciones reguladoras más utilizadas con este enzima son determinados aminoalcoholes como la dietanolamina, el 2-amino-1-propanol, tris(hidroximetil)-aminometano y otros (M. P. Kreuzer, C. K. O'Sullivan, G. G. Guibault, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 393, 95). Estas disoluciones no sólo fijan el pH sino que favorecen la reacción enzimática al atrapar grupos fosfato. Una de las principales utilidades de la fosfatasa alcalina es su empleo como marca en el seguimiento de ensayos de afinidad. En estas aplicaciones, presenta la ventaja de mantener constante su actividad catalítica durante elevados periodos de tiempo, lo que se traduce en una mejora de los límites de detección con un simple aumento del tiempo de reacción.

Todas estas características hacen que la fosfatasa alcalina sea uno de los enzimas más utilizados en el marcaje de material proteico (biotina, estreptavidina, inmunoglobulinas) o hebras de ADN.

Para el revelado de ensayos de afinidad donde se utilizan reactivos marcados con fosfatasa alcalina existe una amplia gama de sustratos enzimáticos disponibles como: fenil fosfato, nitrofenil fosfato, aminofenil fosfato, naftil fosfato, 4-metil umbeliferil fosfato, fenoltaleín difosfato, hidroquinona difosfato etc.

Como sustratos pertenecientes a la familia de los sustratos indoxílicos, los más utilizados con la fosfatasa alcalina suelen ser el 3-indoxil fosfato, el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato (BCIP), el 5-bromo-6-cloro-3-indoxil fosfato y el 6-cloro-3-indoxil fosfato. En estos casos el sistema de detección es generalmente semi-cuantitativo y se basa en

la determinación del producto enzimático, insoluble y coloreado de la familia del índigo, que se genera. Por ello, estos sustratos están especialmente recomendados en ensayos que requieren productos insolubles, como son aquellos realizados generalmente sobre soportes sólidos tales como geles, membranas de nylon o papel de nitrocelulosa.

El sustrato denominado BCIP es utilizado comúnmente en estudios inmunohistoquímicos, presentando una sensibilidad limitada en algunos ensayos. Para subsanar este inconveniente se puede combinar con una sal de tetrazolio denominada comercialmente como NBT generando un nuevo sustrato, el BCIP/NBT, mucho más sensible que el anterior ya que combina la formación de dos productos enzimáticos insolubles: uno de la familia del índigo y otro un formazán.

El objeto de la presente invención es la combinación de un sustrato indoxílico (ejemplo- BCIP) con una disolución que contenga iones Ag^+ (ejemplo- BCIP/ Ag^+) como sustrato más sensible que aquel que hace uso exclusivamente del sustrato indoxílico. El sustrato de esta patente es también una alternativa al sustrato que combina el uso del BCIP con el NBT como sensibilizador o amplificador de la señal.

El sustrato de la presente invención genera plata metálica (Ag^0) junto con el producto de la familia del índigo en la zona de actividad enzimática, intensificando la presencia del precipitado insoluble y oscureciendo su color. Así, se favorece la detección visual del producto con o sin ayuda de un microscopio. La formación de plata metálica facilita el uso de microscopía electrónica o reflectancia en la etapa de detección. La cuantificación de la plata metálica por técnicas instrumentales, como son las técnicas electroquímicas y las técnicas óptico-espectroscópicas o el uso de una balanza piezoeléctrica, facilita la realización ensayos cuantitativos.

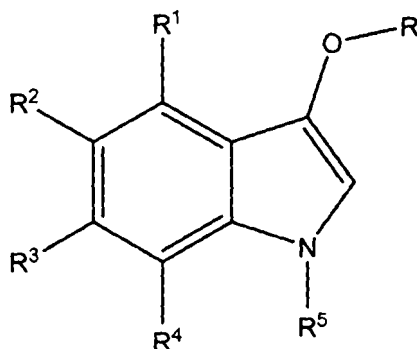
El empleo de sustratos indoxílicos en ensayos enzimáticos ha implicado la realización de ensayos semi-cuantitativos debido a la dificultad de cuantificar el producto insoluble generado. Recientemente se ha publicado un artículo en el que la cuantificación enzimática se basa en medidas fluorescentes de intermedios de la reacción (K. E. Achyutan, *Langmuir*, 2004, 20, 2424). En nuestro grupo de investigación se ha propuesto la detección directa de índigo generado y adsorbido sobre la superficie de un electrodo de pasta de carbono (C. Fernández-Sánchez, A. Costa-García, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 402, 119) o la cuantificación de este producto enzimático tras su solubilización: a través de una etapa de sulfonación (P. Fanjul-Bolado, M. B. González-García, A. Costa-García, *Talanta*, 2004, 64, 452) o a través de su reducción en un medio básico (P. Fanjul-Bolado, M. B. González-García, A. Costa-García, *Anal. Chim. Acta*, 2005, 534, 231). Otra de las posibilidades existentes se basa en la realización de medidas de impedancia o en el empleo de una balanza piezoeléctrica capaz de realizar medidas cuantitativas en función de la masa de índigo depositada sobre su superficie (F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner, *Chemistry-A Eur. J.*, 2003, 9(5), 1137). La utilización del peróxido de hidrógeno que se genera en la etapa de dimerización y de formación del producto de la familia del índigo también ha sido la base para llevar a cabo la cuantificación de Beta-D-galactosidasa (H. Arakawa, A. Tsuji, M. Maeda, *J. of Biolum. & Chemilum*, 1998, 13(6), 1137). El objeto de la presente invención es también facilitar la medida de la actividad enzimática basándose en la medida de la plata metálica (Ag^0) depositada en el lugar de la reacción enzimática.

Descripción de la invención

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un sustrato enzimático que comprende un compuesto indoxílico y una fuente de plata, en adelante este sustrato enzimático será denominado como sustrato de la invención. A lo largo de la descripción se entenderá por fuente de plata cualquier compuesto que pueda servir como aporte de iones plata al sustrato de la invención, preferentemente dicho compuesto se encontrará en disolución. La hidrólisis enzimática de un sustrato indoxílico va acompañada por una siguiente oxidación y dimerización espontánea del indoxilo libre para generar como producto, un compuesto de la familia del índigo. La presencia en el medio de reacción de iones Ag^+ hace que la oxidación del indoxilo vaya acompañada de una reducción de iones Ag^+ a plata metálica (Ag^0) (ver figura 1). De esta forma se genera, como producto de la reacción enzimática, un compuesto de la familia del índigo y un depósito de plata metálica.

La presencia de plata acelera la reacción enzimática de oxidación del indoxilo y favorece que el producto obtenido tenga unas mejores características de detectabilidad. Por ello, la sensibilización de ensayos para la medida de la actividad enzimática viene dada tanto por el aumento de la velocidad de la reacción enzimática como por la facilidad para realizar un análisis cualitativo o cuantitativo de plata metálica.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el compuesto indoxílico tiene una fórmula general:



donde R es un grupo de reconocimiento enzimático preferentemente del tipo fosfato, acetato, sulfato, butirato, caprilato, nonanoato, oleato, palmitato, un resto glicídico, fosforilcolina o un grupo sintetizado específicamente para ser reconocido por un enzima de interés,

donde R¹, R², R³ y R⁴ son iguales o diferentes entre sí y representan un átomo de hidrógeno, bromo, cloro, flúor o yodo, ó un grupo nitro o un ácido sulfónico, y

donde R⁵ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, acetilo o tosilo.

En una realización más preferida y según la realización anterior de la invención, R¹ es cloro o hidrógeno, R³ es cloro, flúor o hidrógeno, R⁴ es bromo o hidrógeno y R⁵ es hidrógeno o un grupo metilo.

En una realización aun más preferida de la presente invención, el sustrato indoxílico es del tipo 5-bromo-4-cloro-3-indoxil, 5-bromo-6-cloro-3-indoxil, 5-bromo-3-indoxil, 6-cloro-3-indoxil, 3-indoxil, 4-cloro-3-indoxil, 6-bromo-3-indoxil, 6-fluoro-3-indoxil, 5,7-dibromo-3-indoxil, 4,5-dicloro-3-indoxil, 5-yodo-3-indoxil, 5-nitro-3-indoxil, 5-sulfo-3-indoxil y el N-metil-3-indoxil. Entre ellos los más útiles son preferentemente aquellos cuya estructura indólica es una de las siguientes: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil y 3-indoxil. En una realización aun más preferida, la concentración del sustrato indoxílico en la disolución del sustrato enzimático puede ser muy variada-siendo preferentemente entre 0.5 mM y 24 mM.

En otra realización preferida de la presente invención la plata puede provenir de cualquier sal de plata, más preferentemente de nitrato de plata, acetato de plata y lactato de plata. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, la concentración de plata está comprendida preferentemente entre 0.1 mM y 10 mM.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el sustrato de la invención comprende un proporción de compuesto indoxílico de al menos el, 29%, 50% ó 94%, respecto del total del sustrato.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el sustrato de la invención comprende una proporción de plata de al menos el 6%, 50%, 71%, respecto del total del sustrato.

En los ensayos enzimáticos el sustrato de la invención se puede modificar para mejorar sus propiedades, preferentemente con la adición de otros componentes como seroalbúmina bovina, surfactantes estabilizantes e iones metálicos, donde dichos iones metálicos son preferentemente: magnesio, zinc, cobalto, manganeso, níquel y calcio.

Este sustrato de la invención se puede utilizar para la medida de la actividad de un enzima libre en disolución o que actúa como agente de marcaje de reactivos inmunológicos, hebras de ADN o cualquier otro reactivo que intervenga en ensayos de afinidad. Por ello la medida de actividad enzimática puede ser importante tanto si el enzima es el analito de interés como si su actividad está relacionada con la concentración del analito de interés como en inmunoensayos o en ensayos de hibridación de ADN.

Así un segundo aspecto de la presente invención se relaciona con un método para la detección de la actividad enzimática que comprende poner en contacto el sustrato de la invención con una muestra que presenta actividad enzimática, se espera un tiempo para que tenga lugar la reacción y se lleva a cabo la detección del producto consistente en un depósito de plata metálica y un precipitado coloreado de la familia del índigo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el enzima que cataliza la hidrólisis del sustrato indoxílico comprende pero no se limita a las enzimas elegidas del grupo de las fosfatasas, oxido-reductasas (por ejemplo-peroxidasas), esterasas, lipasas, sulfatasas o glicosidasas.

Los iones Ag⁺ son reducidos en presencia de la luz directa para generar plata metálica. Al realizar un ensayo enzimático con el nuevo sustrato la acción del enzima puede ser interferida por la acción de la luz intensa. Por ello

resulta de especial importancia para algunas aplicaciones, la realización de los ensayos enzimáticos en oscuridad con el fin de evitar la posible reducción de iones Ag^+ por acción de la luz.

Una amplia variedad de métodos pueden ser utilizados para detectar el depósito conjunto de un producto de la familia del índigo y de plata metálica. Algunos de estos métodos pueden ser aplicados especialmente con este sustrato al co generar plata en el lugar de reacción. Se pueden destacar los siguientes: detección visual con o sin ayuda de un microscopio, medidas de reflectancia, microscopía electrónica, detección con técnicas electroquímicas, detección con técnicas óptico- espectroscópicas, empleo de balanza piezoeléctrica, etc.

En una realización preferida del método de la invención, este es llevado a cabo sobre soportes sólidos que comprenden pero no se limitan a placas de pocillos, soportes de cristal, bolas de poliestireno, bolas magnéticas, membranas cromatográficas, membranas de poliestireno, de nylon o de nitrocelulosa, papel de filtro, geles, partículas de látex, chips, electrodos sólidos, etc. Un tercer aspecto de la presente invención se relaciona con el uso del sustrato de la invención en la realización de numerosas aplicaciones entre las que destacan preferentemente los inmunoensayos, ensayos de hibridación de ADN, técnicas de tinción proteica, ensayos histoquímicos y citoquímicos, tinción de bacterias en ensayos microbiológicos, etc.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Mecanismo de acción del enzima sobre el sustrato indoxílico y de formación de la plata metálica en el lugar de reacción. Donde R es un grupo de reconocimiento enzimático del tipo fosfato, acetato, sulfato, butirato, caprilato, nonanoato, oleato, palmitato, un resto glicídico, fosforilcolina o un grupo sintetizado específicamente para ser reconocido por un enzima de interés.

Figura 2

Fotografía de ensayos realizados sobre una membrana de nitrocelulosa. Columna A: fosfatasa alcalina + 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato. Columna B: fosfatasa alcalina + 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato + nitrato de plata. Columna C: fosfatasa alcalina + nitrato de plata. Columna D: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato + nitrato de plata.

Figura 3

Fotografía de ensayos realizados sobre una membrana de nitrocelulosa a los 5 minutos de reacción enzimática. Fila 1: inmunoglobulina G marcada con fosfatasa alcalina + 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato. Fila 2: inmunoglobulina G marcada con fosfatasa alcalina + 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato + nitrato de plata.

Figura 4

Voltamperogramas cíclicos obtenidos en 0.1 M Tris pH 9.8 (6 mM de 3- indoxil fosfato y 0.4 mM de AgNO_3) para un electrodo serigrafado en cuya superficie se ha inmovilizado fosfatasa alcalina biotinilada (a través de la fijación previa de estreptavidina) procedente de una disolución $4.5 \cdot 10^{-11}$ M (A) y para un electrodo en cuya superficie no se ha inmovilizado fosfatasa alcalina biotinilada (B).

Figura 5

Fotografía de ensayos realizados sobre una membrana de nitrocelulosa a los 15 min de reacción enzimática. Columna A: Acetil colinesterasa + nitrato de plata. Columna B: Acetil colinesterasa + 3-Indoxil acetato. Columna C: Acetil colinesterasa + 3-Indoxil acetato + nitrato de plata.

Ejemplos de realización de la invención

El sustrato de la presente invención combina un compuesto indoxílico (reactivo 1) con una fuente de plata (reactivo 2). Ambos reactivos pueden encontrarse en estado sólido y ser disueltos en el momento de realizar el ensayo enzimático. Los reactivos 1 y 2, también pueden ser disoluciones estables individualmente que son mezcladas en el momento de realizar el ensayo enzimático. Tiene especial interés el sustrato que combina los reactivos 1 y 2 mezclados en una disolución estable y preparada para su uso directo. Al ser una disolución preparada para su uso directo ha de estar realizada en una disolución reguladora con un pH y una concentración óptima para asegurar la mayor actividad enzimática. En función del enzima a determinar el pH óptimo es diferente aunque casi siempre está en un rango comprendido entre 3 y 11. La concentración de la disolución reguladora se puede variar aunque preferentemente está en un rango comprendido entre 1 mM y 500 mM.

ES 2 289 927 A1

La eficacia del sustrato objeto de la presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no pretenden ser limitativos de su alcance.

5 Ejemplo 1

Este ejemplo muestra el uso combinado del sustrato *5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato* con una disolución de AgNO_3 , en una relación 1:1 (50-50%), para la detección de la actividad del enzima fosfatasa alcalina inmovilizada sobre una membrana de nitrocelulosa. Cualitativamente se explica el mecanismo químico de la invención.

La metodología empleada es la siguiente. Sobre una membrana de nitrocelulosa se añaden las siguientes mezclas de reactivos:

- Columna A, se adicionan 2 μl de una disolución acuosa de fosfatasa alcalina (2 mg/ml) y se deja secar. A continuación se añaden 2.5 μl del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato (24 mM) en una disolución reguladora 0.1 M de Tris pH 9.8.

- Columna B, se adicionan 2 μl de una disolución acuosa de fosfatasa alcalina (2 mg/ml) y se deja secar. A continuación se añaden 2.5 μl del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato (24 mM) y otros 2.5 μl de una disolución de AgNO_3 (24 mM) en una disolución reguladora 0.1 M de Tris pH 9.8.

- Columna C, se adicionan 2 μl de una disolución acuosa de fosfatasa alcalina (2 mg/ml) y se deja secar. A continuación se añade 2.5 μl de una disolución de AgNO_3 (24 mM) en una disolución reguladora 0.1 M de Tris pH 9.8.

- Columna D, se añaden sobre la membrana de nitrocelulosa directamente 2.5 μl del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato (24 mM) y otros 2.5 μl de una disolución de AgNO_3 (24 mM) en una disolución reguladora 0.1 M de Tris pH 9.8.

En la Figura 2 se observan los siguientes resultados:

- Columna A, aparición de color azul debido a la generación del producto enzimático de la familia del índigo.

- Columna B, aparición de un intenso color gris-azulado debido a la formación de plata metálica junto con el índigo en el medio de reacción.

- Columna C, se aprecia ausencia de coloración al realizarse el ensayo en ausencia del compuesto indoxílico. El enzima no actúa directamente sobre la plata iónica sino que la reducción de ésta tiene lugar cuando el enzima actúa previamente sobre el sustrato indoxílico.

- Columna D, se aprecia ausencia de coloración al realizar el ensayo en ausencia del enzima fosfatasa alcalina. La generación espontánea de plata metálica en las condiciones de reacción es inapreciable.

La aparición de un precipitado gris de plata metálica es observada únicamente en el lugar de reacción donde se encuentran conjuntamente el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato, la disolución de Ag^+ y el enzima fosfatasa alcalina (figura 2, columna B).

El mecanismo de reacción es el propuesto en la figura 1 donde el compuesto indoxílico es el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato y el enzima es la fosfatasa alcalina.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra el uso de un sustrato enzimático basado en la combinación de un éster indoxílico denominado *5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato* y una disolución de plata (AgNO_3), en una relación 1:1 (50-50%), para sensibilizar la detección de una inmunoglobulina G marcada con fosfatasa alcalina (IgG-AP). Para ello se realiza el siguiente procedimiento.

Sobre una membrana de nitrocelulosa se adicionan 1.5 μl de una disolución de inmunoglobulina G de cabra marcada con fosfatasa alcalina (diluida 1:1000 en una disolución reguladora 0.1 M Tris pH 7.2) y se deja secar a temperatura ambiente. A continuación se añade:

-Fila 1: 2 μl de una disolución 12 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato en 0.1 M Tris pH 9.8.

-Fila 2: 2 μl de una disolución 12 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato y 12 mM de AgNO_3 en 0.1 M Tris pH 9.8.

Transcurridos 5 minutos desde la adición del sustrato enzimático se obtienen los siguientes resultados (ver figura 3):

- Fila 1: apenas se aprecia un ligero color azul debido a la acción de la fosfatasa alcalina sobre el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato en los primeros 5 minutos.

- Fila 2: se observa una coloración azul-grisácea intensa debido a la formación de plata metálica y de un compuesto de la familia del índigo en la zona donde se encuentra presente la inmunoglobulina G marcada con fosfatasa alcalina.

Realizando una detección cualitativa, el ojo humano percibe una coloración más intensa y más oscura en las muestras correspondientes a la fila 2 en las que se emplea el sustrato objeto de la presente invención. Se puede decir, por tanto, que el nuevo sustrato propuesto es más sensible que aquel que hace uso exclusivamente del 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato. La plata presente en la disolución amplifica la señal analítica actuando como sensibilizador.

Ejemplo 3

En este caso se hace uso de un sustrato enzimático basado en la *combinación del 3-indoxil fosfato* y una disolución de plata, en una relación 15:1 (94-6%), para seguir cuantitativamente la interacción entre la estreptavidina y la biotina marcada con fosfatasa alcalina, sobre un electrodo serigrafiado de pasta de carbono. La metodología empleada consta de las siguientes etapas:

- Activación del electrodo serigrafiado de pasta de carbono. Se adicionan 50 μ l de una disolución 0.1 M de H_2SO_4 durante 2 minutos con una intensidad de corriente de 5 μ A.

- Etapa de lavado de la celda electroquímica con una disolución reguladora 0.1 M Tris pH 7.2.

- Inmovilización de la estreptavidina sobre el electrodo de trabajo. Se adicionan 10 μ l de una disolución de estreptavidina sobre el electrodo de trabajo. La fijación de esta capa sensora tiene lugar durante toda la noche a 4°C.

- Etapa de lavado de la celda electroquímica con una disolución reguladora 0.1 M Tris pH 7.2.

- Etapa de bloqueo de la superficie del electrodo. Se añaden 40 μ l de una disolución de seroalbúmina bovina al 2% que bloqueará el electrodo durante 15 min a temperatura ambiente.

- Etapa de lavado con una disolución reguladora 0.1 M Tris pH 7.2.

- Desarrollo de la reacción inmunológica. Se añaden 40 μ l de una disolución de fosfatasa alcalina biotinilada a la celda electroquímica y se deja reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente.

- Etapa de lavado con una disolución reguladora 0.1 M Tris pH 9.8.

- Desarrollo de la reacción enzimática haciendo uso de un sustrato objeto de la presente invención. En este caso concreto se adicionan 35 μ l de una disolución 6 mM de 3-indoxil fosfato, 0.4 mM de $AgNO_3$ en una disolución reguladora 0.1 M Tris pH 9.8. Se deja reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

- Revelado de la señal. Una vez transcurrida la reacción enzimática se ha depositado plata metálica sobre la superficie del electrodo en el que está presente el enzima fosfatasa alcalina. Para detectar este metal depositado, se realiza un barrido electroquímico por voltamperometría cíclica desde -0.2V hasta +0.5V en el mismo medio de reacción.

En la figura 4, se observa el voltamperograma cíclico realizado para un sensor correspondiente a una concentración $4.5 \cdot 10^{-11}$ M de biotina marcada con fosfatasa alcalina (curva A) y el voltamperograma realizado para un sensor en ausencia de biotina marcada con fosfatasa alcalina (curva B).

En este caso, la detección de mínimas cantidades de plata no puede ser realizada visualmente como en los ejemplos 1 y 2, por lo que se hace uso de una técnica instrumental electroquímica. Al hacer un barrido de potenciales se registra la redisolución de la plata depositada (curva A) cuya intensidad es proporcional a la cantidad de plata depositada y por ello a la cantidad de enzima fijada en la superficie del electrodo.

De este modo y a través de una redisolución voltamperométrica de plata se logra un límite de cuantificación de $4.5 \cdot 10^{-13}$ M de fosfatasa alcalina biotinilada.

El sustrato objeto de la presente invención es, por tanto, un sustrato válido para la realización de ensayos enzimáticos cuantitativos basados en la detección de plata.

ES 2 289 927 A1

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra el uso de un sustrato enzimático basado en la combinación de un éster indoxílico denominado *3-indoxil acetato* y una disolución de plata (AgNO_3), en una relación 1:2.5 (29-71%), para sensibilizar la detección de una Acetil colinesterasa. Para ello se realiza el siguiente procedimiento.

Sobre una membrana de nitrocelulosa se adiciona $1\ \mu\text{l}$ de una disolución del enzima Acetil Colinesterasa (preparada en una reguladora 0.1 M Tris pH 8.0) y se deja secar a temperatura ambiente. A continuación de añade:

Columna A: $1.5\ \mu\text{l}$ de una disolución 3 mM de AgNO_3 en 0.1 M Tris pH 8.0.

Columna B: $1.5\ \mu\text{l}$ de una disolución 1.15 mM de 3-Indoxil acetato en 0.1 M Tris pH 8.0.

Columna C: $1.5\ \mu\text{l}$ de una disolución 3 mM de AgNO_3 y 1.15 mM de 3-Indoxil acetato en 0.1 M Tris pH 8.0.

Transcurridos 15 minutos desde la adición del sustrato enzimático se obtienen los siguientes resultados (ver figura 5):

- Columna A: no se aprecia aparición de color debido a la ausencia del compuesto indoxílico. El enzima no actúa directamente sobre la disolución de plata iónica.

- Columna B: se observa una débil coloración azul debido a la generación de azul de índigo en el medio de reacción que contiene enzima y compuesto indoxílico.

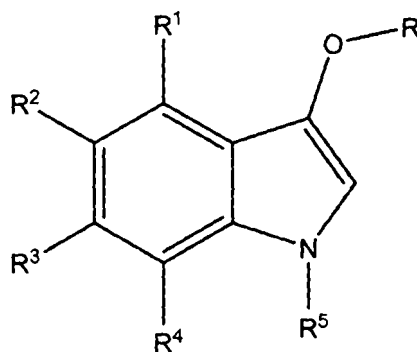
- Columna C: se observa una coloración azul-grisácea intensa debido a la formación conjunta de azul de índigo y de plata metálica en la zona donde se encuentra presente el enzima Acetil Colinesterasa.

A través de una detección cualitativa basada en la intensidad de la coloración generada sobre una membrana de nitrocelulosa, se puede decir que el sustrato objeto de la presente invención, que combina el 3-Indoxil acetato con una disolución de plata, sensibiliza los resultados que se obtienen cuando se utiliza ese mismo sustrato en ausencia de la plata.

REIVINDICACIONES

1. Sustrato enzimático que comprende un compuesto indoxílico y una fuente de plata.

2. Sustrato enzimático, según la reivindicación 1, donde el compuesto indoxílico tiene de fórmula general:



donde R es un grupo seleccionado de entre el grupo fosfato, acetato, sulfato, butirato, caprilato, nonanoato, oleato, palmitato, un resto glicídico, fosforilcolina o un grupo sintetizado específicamente para ser reconocido por un enzima,

donde R¹, R², R³ y R⁴ son iguales o diferentes entre sí y representan un átomo de hidrógeno, bromo, cloro, flúor o yodo, 6 un grupo nitro o un ácido sulfónico, y

donde R⁵ representa un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, acetilo o tosilo.

3. Sustrato enzimático según la reivindicación anterior donde R¹ es Cloro o hidrógeno, R³ es flúor, cloro o hidrógeno, R⁴ es bromo o hidrógeno y R⁵ es hidrógeno o un grupo metilo.

4. Sustrato enzimático, según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la estructura indólica del compuesto indoxílico es del tipo 5-bromo-4-cloro-3-indoxil, 5-bromo-6-cloro-3-indoxil, 5-bromo-3-indoxil, 6-cloro-3-indoxil, 3-indoxil, 4-cloro-3-indoxil, 6-bromo-3-indoxil, 6-fluoro-3-indoxil, 5,7-dibromo-3-indoxil, 4,5-dicloro-3-indoxil, 5-yodo-3-indoxil, 5-nitro-3-indoxil, 5-sulfo-3-indoxil y el N-metil-3-indoxil.

5. Sustrato enzimático, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la estructura indólica del compuesto indoxílico es del tipo 3-indoxil ó 5-bromo-4-cloro-3-indoxil.

6. Sustrato enzimático, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuya fórmula es 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato, 3-indoxil acetato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato ó del 3-indoxil fosfato.

7. Sustrato enzimático, según la cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado** porque el compuesto indoxílico está en disolución en una concentración entre 0.5 mM y 24 mM.

8. Sustrato enzimático, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, **caracterizado** porque la plata está en disolución en una concentración entre 0.1 mM y 10 mM.

9. Sustrato enzimático, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **caracterizado** porque la fuente de plata es preferentemente nitrato de plata, acetato de plata o lactato de plata.

10. Sustrato enzimático, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, **caracterizado** por ser una disolución estable que comprende un compuesto indoxílico y plata en una disolución reguladora, y que está preparada para su uso directo.

11. Sustrato enzimáticos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la proporción del compuesto indoxílico es de al menos el 29% respecto al total del sustrato.

12. Sustrato enzimático, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la proporción de plata es de al menos el 6%, respecto al total de sustrato, respecto al total del sustrato.

13. Método para la detección de actividad enzimática que comprende las siguientes etapas:

- Puesta en contacto de una muestra que contiene enzimas con un sustrato enzimático según cualquiera de las reivindicaciones anteriores
- Detección del producto formado consistente en un depósito de plata y un compuesto coloreado de la familia del índigo.

ES 2 289 927 A1

14. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque el enzima es seleccionado preferentemente del grupo de las fosfatasas, oxido-reductasas, esterasas, lipasas, sulfatasas y glicosidasas.

5 15. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, donde la detección se realiza preferentemente: de modo visual con o sin ayuda de un microscopio, a través de medidas de reflectancia o microscopía electrónica, detección con técnicas electroquímicas, detección con técnicas óptico-espectroscópicas o mediante el empleo de una balanza piezoeléctrica.

10 16. Un método, según la cualquiera de las reivindicaciones 13-15, **caracterizado** porque es realizado sobre un soporte sólido como placas de pocillos, soportes de cristal, bolas de poliestireno, bolas magnéticas, membranas cromatográficas, membranas de poliestireno, de nylon o de nitrocelulosa, papel de filtro, geles, partículas de látex, chips o electrodos sólidos.

15 17. Uso de un sustrato según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en inmunoensayos, ensayos de hibridación de ADN, ensayos de tinción proteica, ensayos histoquímicos o citoquímicos y tinción de bacterias en análisis microbiológicos.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

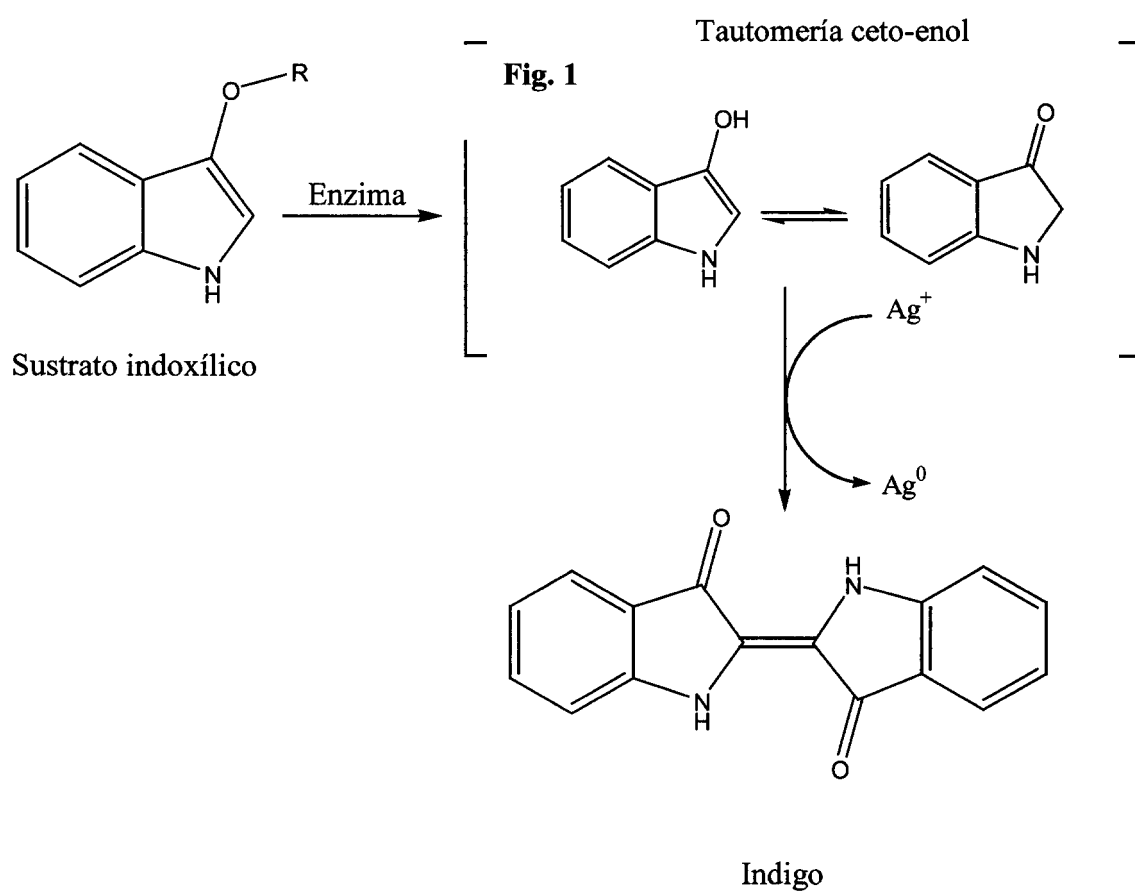


Fig. 2

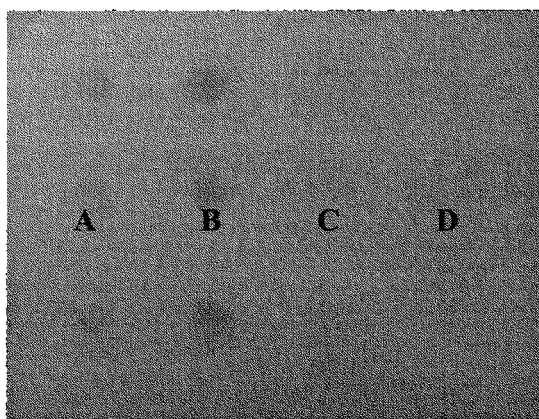


Fig. 3

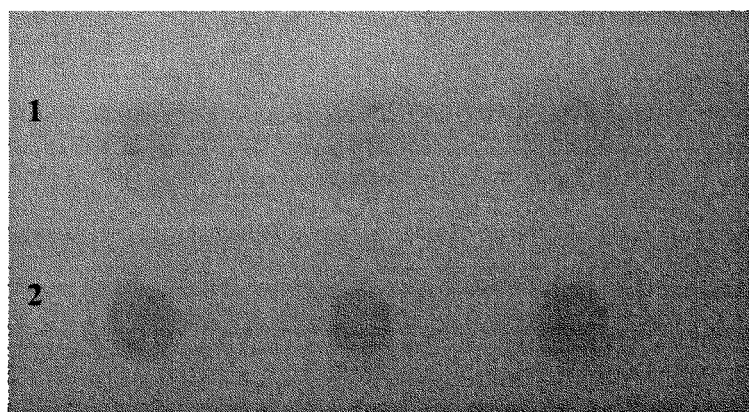


Figura 4

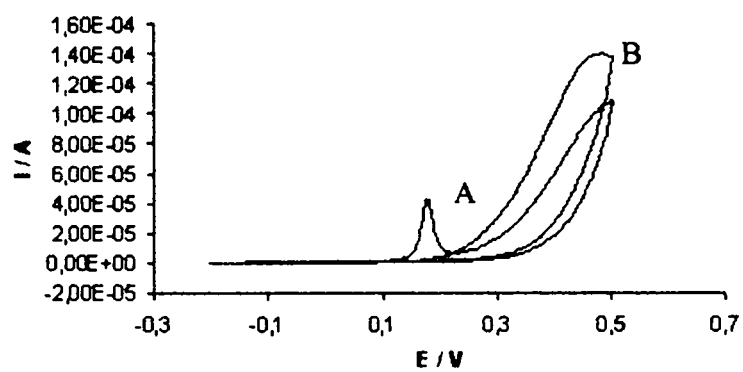
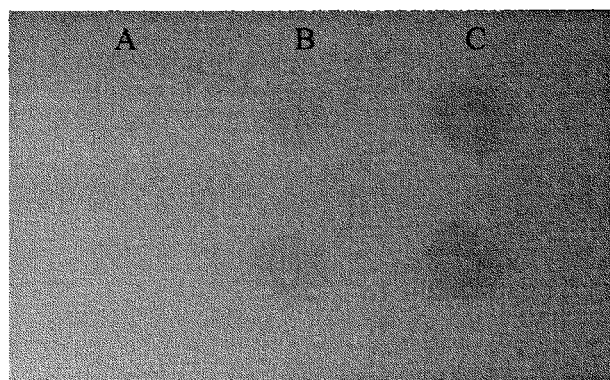


Fig. 5





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 289 927

⑫ Nº de solicitud: 200601269

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 17.05.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9604400 A1 (MEDILITE DIAGNOSTIKA) 15.02.1996, todo el documento.	1-17
A	WO 02079846 A2 (BIOMERIEUX) 10.10.2002, reivindicaciones 2-8.	1-17
A	FANJUL-BOLADO et al., TALANTA 2004, vol. 64, páginas 452-457. Elsevier. "Voltammetric determination of alkaline phosphatase and horseradish peroxidase activity using 3-indoxil phosphatase as substrate. Application to enzyme immunoassay". Todo el documento.	1-17

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

26.12.2007

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/42 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/44 (2006.01)

C07D 209/36 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)