



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 303 405**

② Número de solicitud: 200501725

⑤ Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C01G 7/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **06.07.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2008**

Fecha de la concesión: **19.05.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **12.06.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
12.06.2009

⑰ Titular/es: **Universidad de Oviedo
Plaza de Riego, 4 - Edificio Histórico
33033 Oviedo, Asturias, ES**

⑱ Inventor/es: **Costa García, Agustín;
González García, María Begoña y
Escosura Muñiz, Alfredo de la**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Complejos de oro como marca de moléculas.**

㉓ Resumen:

Complejos de oro como marca de moléculas de interés biológico, medioambiental o agroalimentario y descripción de una nueva metodología de marcaje utilizando estos complejos para obtener moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN y facilitar así la cuantificación de las mismas donde proceda. El procedimiento de marcaje consta de dos etapas. La primera es una mezcla y reacción de conjugación entre los complejos de oro y proteína o hebra de ADN cumpliendo unas relaciones molares proteína (o ADN)/complejo de oro. La segunda etapa es la purificación mediante diálisis del conjugado obtenido. Las moléculas marcadas siguiendo esta metodología se pueden utilizar en diferentes ensayos de afinidad donde se lleve a cabo la detección de antígenos de interés biológico o bien secuencias de ADN determinantes de un patógeno. Esta invención es de aplicación a sectores muy variados como análisis clínicos, medio ambiente o análisis de alimentos.

ES 2 303 405 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Complejos de oro como marca de moléculas.

5 El objeto de la presente invención es tanto el uso de complejos de oro como nueva marca de moléculas, como una metodología de marcaje utilizando dichos complejos para obtener moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN sin necesidad de agentes químicos intermedios de enlace. Resulta de aplicación a ensayos de afinidad principalmente en los sectores de análisis clínicos, medio ambiente o agroalimentario.

10 **Antecedentes de la invención**

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, o bien antígenos o anticuerpos marcados o hebras de ADN marcadas. A pesar de que las marcas enzimáticas son las más utilizadas, en las pasadas décadas se han desarrollado tanto inmunoensayos como ensayos de hibridación de ADN electroquímicos que usan marcas electroactivas, entre ellos inmuno y genosensores.

20 Polarografía diferencial de pulso (DPP), voltamperometría diferencial de pulso de barrido anódico (DPASV), voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y análisis de barrido potenciométrico (PSA) son métodos electroquímicos extremadamente sensibles, usados para la determinación de trazas de estas marcas.

25 En el caso de los inmunoensayos electroquímicos el marcaje consiste en unir el antígeno o anticuerpo con un grupo que le proporciona electroactividad. Debe ser posible reducir/oxidar al antígeno marcado en un rango de potenciales al cual el antígeno no es electroactivo, lo que permite distinguir el antígeno no marcado del marcado.

30 Las marcas electroactivas utilizadas para la detección de diferentes antígenos han sido muy variadas y comprenden cinco grupos: moléculas inorgánicas electroactivas como el hexacianoferrato (II) (K.S. Lee, T-H Kim, M-C Shin, W-Y. Lee, J-K. Park, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 380, 17), marcas organometálicas como el ferricinio, cobaltoceno o ferroceno (K. Di Gleria, H.A.O. Hill, C.J. McNeil, *Anal. Chem.*, 1986, 58, 1203; B.Limoges, C. Degrand, P. Brossier, *J. Electroanal. Chem.*, 1996, 402, 175; L.X Tiefenauer, S. Kossek, C.Padeste, P.Thiébaud, *Biosens.Bioelectron.*, 1997, 12, 213), compuestos orgánicos con propiedades redox tales como el 2,4-dinitrofenol o el azul de Nilo (A.Costa-García, M.T. Fernández-Abedul, P. Tuñón-Blanco, *Talanta*, 1994, 41, 1191; M.D. Sánchez Suárez, A. Costa-García, *Talanta*, 1997, 44, 909; K. Sugawara, Y. Yamauchi, S. Hoshi, K. Akatsuka, F.Yamamoto, S. Tanaka, H. Nakamura, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1996, 41, 167), coloides metálicos como el oro coloidal (M.B. González-García, A.Costa-García, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1995, 38, 389; M.B.González-García, C. Fernández-Sánchez, A. Costa-García, *Biosens. Bioelectron.*, 2000, 15, 315; M.B.González-García, A. Costa-García, *Biosens. Bioelectron.*, 2001, 15, 663; M. Dequaire, C. Degrand, B. Limoges, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 5521) e iones metálicos como el indio (III), bismuto (III) o cobre (II) (M.J. Doyle, H.B. Halsall, W.R. Heineman, *Anal. Chem.*, 1982, 54, 2318; F.J. Hayes, H.B.Halsall, W.R Heineman, *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1860; E.P. Medyantseva, E.V. Khaldeeva, N.I. Glushko, H.C. Budnikov, *Anal. Chim. Acta*, 2000, 411, 13; Guo W, Song J-F, Zhao M-R, Wang J-X (1998) *Anal. Biochem.*, 1998, 259, 74). Estos últimos dan lugar a métodos muy sensibles pero el método de marcaje es muy tedioso y exige muchos pasos de purificación. Para unir estos iones metálicos al antígeno o anticuerpo es necesario utilizar un agente químico intermedio de enlace (agente quelante), el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), que actúa como puente entre la molécula y los iones.

35 Si se trata de ensayos de hibridación de ADN, lo más habitual ha sido utilizar complejos de metales o compuestos orgánicos que se intercalan en la doble hebra, diferenciando hebra sencilla de doble hebra, pero que no enlazan a las hebras (J. Wang, G. Rivas, S. Cai, *Electroanalysis*, 1997, 9(5), 395; J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, *Anal. Chim. Acta*, 1996, 326, 141; K.M. Millan, S.R. Mikkelsen, *Anal. Chem.*, 1993, 65, 2317; G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 387, 297; G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini, *Biosens. Bioelectron.*, 1999, 14, 43; K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori, *Anal. Chem.*, 1994, 66, 3830; P. Kara, B. Meric, A. Zeytinoglu, M. Ozsoz, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 518, 69; S. Takenaka, Y. Uto, H. Saita, M. Yokoyama, H. Kondo, W.D. Wilson, *Chem. Commun.*, 1998, 1111); aunque existen ciertos compuestos orgánicos y algunos complejos de platino que se unen químicamente a las hebras de ADN y que se pueden detectar electroquímicamente o mediante un proceso catalítico, o bien porque este complejo de platino actúa como agente enlazante entre la molécula y una marca como fluoresceína, biotina, etc que se pueda detectar electroquímicamente u ópticamente (A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, U.S. Akarca, M. Ozsoz, *Anal. Chim. Acta*, 2000, 422, 139; S.S. Babkina, N.A. Ulakhovich, E.P. Medyantseva, Y.I. Zyavkina, *J. Anal. Chem.*, 1999, 54(11), 1206; S. S. Babkina, N.A. Ulakhovich, Y.I. Zyavkina, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 502, 23).

40 Por otro lado, en las últimas décadas, ha surgido un gran interés por el estudio de las propiedades de los metales de transición como terapéuticos potentes. Por ejemplo, se sabe desde hace más de 20 años que el cis-diamonidicloroplatino (II) es activo contra el cáncer de testículos, ovarios, cabeza y cuello (A. Prestayko, S. Crooke, S. Carter, Academic Press, New York, 1980).

65 El aurotiomalato de sodio y otros complejos de oro, como la auranofina o el aurotiosulfato, son usados en el tratamiento de la artritis reumatoide, desde hace más de 70 años (F. Berglof, K. Berglof, D. Waltz, *J. Rheumatol.*, 1978, 5, 68).

ES 2 303 405 B1

Moller-Pedersen y col. (S. Moller-Pedersen, *Biochemical Pharmacology*, 1985, 34, 4319; S. Moller-Pedersen, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1986, 45, 712; S. Moller-Pedersen, *Biochemical Pharmacology*, 1986, 35, 2407; S. Moller-Pedersen, *Biochemical Pharmacology*, 1987, 36, 2661) estudiaron la unión entre la albúmina de suero humano (HSA) y el oro procedente de sales de oro (I), tales como aurotiomalato y aurotiosulfato de sodio, dado que estudios
5 previos realizados en pacientes a los que se les suministraban estas drogas, habían sugerido que la mayor parte del oro que se incorporaba a la circulación sanguínea estaba unido a moléculas de albúmina. Para descubrir el mecanismo de esta unión, llevaron a cabo una serie de estudios, *in vitro* y en condiciones fisiológicas, concluyendo que la albúmina posee un sitio de gran afinidad por el oro, con una constante de asociación $K_1 = 3 \times 10^4 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$, que es el grupo tiol (SH) de la cisteína 34, y tres o más sitios de menor afinidad, cuya suma de constantes de asociación es $K_2 = 10^3 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$.

Estos autores concluyen también que las condiciones de pH y fuerza iónica son muy importantes para que el aurotiomalato en disolución esté en forma de anión monomérico ($\text{AuSH}_3\text{C}_4\text{O}_4^{2-}$). A pH bajos, fuerza fónica elevada y alta concentración de aurotiomalato, se forman polímeros de bajo peso molecular, que afectan a la interacción con la
15 albúmina (A. Anvarhusein, P. Sadler, *J.C.S. Dalton*, 1981, 1657).

Previamente, Coffey y col. (M. Coffey, C. Shaw, M. Eidsness, *J. Inorg. Chem.*, 1986, 25, 333) habían realizado estos estudios para albúmina de suero bovino (BSA) y aún en los últimos años se ha seguido investigando en la interacción del oro (I) con estas moléculas (J. Annapurna, S. Schraa, A. Anvarhusein, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*,
20 1998, 3, 9).

También se ha demostrado que complejos de oro (I) y oro (III) poseen actividad antitumoral. El mecanismo de actuación de estos complejos depende del tipo de ligandos que rodean a la esfera de coordinación del átomo de oro y del estado de oxidación del oro. Así por ejemplo, en el caso de complejos de oro (I) con ligandos tiolatos (caso del aurotiomalato o auranofina) el mecanismo de actuación se cree que es debido a que inhiben el enzima ADN polimerasa y atacan a células con la mitocondria alterada (M.J. McKeage, L. Maharaj, S.J. Berners-Price, *Coordination Chem. Rev.*, 2002, 232, 127). En otros casos, complejos de oro (I) que contienen el ion Cl^- como ligando actúan como droga antitumoral porque se enlazan al ADN y producen su ruptura (C.E. Bleank, J.C. Dabrowiak, *J. Inorg. Biochem.*, 1984, 21, 21; C.K. Mirabelli, J.P. Zimmerman, H.R. Bartus, C-M. Sung, S.T. Crooke, *Biochem. Pharmacol.*, 1986, 35, 1435).
25 En cuanto a los complejos de oro (III), si bien también depende del tipo de ligando, su mecanismo de actuación es similar al que presentan los complejos de platino, es decir, se unen al nitrógeno N7 de guaninas y citosinas vecinales (A. Schimanski, E. Freisinger, A. Erxleben, B. Lippert, *Inorganica Chim. Acta*, 1998, 283, 223; S. Carotti, A. Guerri, T. Mazzei, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, *Inorganica Chim. Acta*, 1998, 281, 90; L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell, P. Zanello, *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 3541; L. Messori, P. Orioli, C. Tempi, G. Marcon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 281, 352) Debido a estas propiedades, se ha estudiado extensamente la interacción de estos complejos de oro con ADN con el fin de entender su mecanismo de actuación y así poder encontrar otros complejos de oro que sean más eficaces en el tratamiento de tumores cancerígenos y presenten menos efectos secundarios que otros agentes anticancerígenos.

Hasta este momento la mención de los complejos de oro ha ido casi exclusivamente ligado a su uso como agentes eficaces en el tratamiento de artritis reumatoide y como agentes anticancerígenos, así como al estudio del mecanismo de actuación de estas drogas en el organismo. Sin embargo, también puede ir unido al de ensayos que impliquen el uso de los mismos como marcas de proteínas y hebras de ADN en análisis clínicos, ambientales, agroalimentarios, etc.

El objeto de la presente patente es el uso de complejos de oro (I) y oro (III) como marca de moléculas de interés biológico, medioambiental o agroalimentario y se describe una nueva metodología de marcaje sin necesidad de agentes químicos intermedios de enlace utilizando estos complejos para obtener moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN y facilitar así la cuantificación de las mismas donde proceda.

Para comprobar la eficacia de marcaje así como el uso de estos complejos como marcas se pueden utilizar métodos analíticos de detección o cuantificación entre los que se encuentran los electroquímicos u óptico-espectroscópicos. Entre los primeros se destacan tres ya publicados e incluso patentados por su alta sensibilidad.

Uno de ellos es la electrodeposición catalítica de plata. En este sentido cabe mencionar el método desarrollado por Costa y colaboradores (D. Hernández Santos, M.B. González García, A. Costa García, *Electrochim. Acta*, 2000, 46, 607; D. Hernandez Santos, M.B. González García, A. Costa García, *Electroanalysis*, 2000, 12, n° 18, 1461; A. de la Escosura-Mufiz, M.B. González-García, A. Costa-García, *Electroanalysis*, 2004, 16, 1561) en el que electrodos de pasta de carbono o de carbono vitrificado son modificados, o bien con oro coloidal por adsorción, o con oro en disolución que ha sido reducido en la superficie del electrodo. Este oro metálico cataliza la reducción de plata en el electrodo. Se basa en que la presencia del metal en el electrodo hace que el potencial de reducción de la plata (en una disolución amoniacal) se desplace hacia potenciales menos positivos. Esto hace que se disponga de un intervalo de potenciales en los cuales sólo se electrodepositará plata en el electrodo si existe metal en la superficie del mismo. La redisolución de esta plata electrodepositada a un potencial comprendido dentro de este intervalo, da lugar a un proceso anódico cuya intensidad de pico está directamente relacionada con la cantidad de metal presente en la superficie del electrodo.
65

Este procedimiento ha sido aplicado al seguimiento de la reacción estreptavidina-biotina, empleando oro coloidal como marca (M.B. González García, A. Costa García, *Biosensors & Bioelect.*, 2000, 15, n° 11-12, 663).

ES 2 303 405 B1

En la patente de Costa y colaboradores ES2102970 se reivindican electroensayos de determinación de oro en disolución y de oro en partículas independientemente de que sean o no marcas utilizadas en electroinmunoensayos de reconocimiento biológico.

5 Otro método que se puede utilizar para detectar moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN es la electrodeposición catalítica de mercurio, método desarrollado por Costa y colaboradores y que es similar al anterior pero en el que el elemento sensibilizador es el mercurio (patente solicitada en 2004, Número de solicitud: P200402382).

10 Por último, el tercer método consiste en la electrodeposición catalítica de hidrógeno, ya utilizada para la detección de complejos de platino (II) unidos a hebras de ADN (D. Hernández-Santos, M.B. González-García, A. Costa-García, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 2868). Utilizando este método, el complejo de oro "marca" sería detectado cronoamperométricamente registrando la intensidad generada al reducirse los protones del medio ácido en el que se registra la señal analítica (HCl).

15 **Descripción de la invención**

Es objeto de la presente invención el uso de complejos de oro como nueva marca de moléculas de interés biológico y una metodología de marcaje sin necesidad de agentes químicos intermedios de enlace utilizando estos complejos para obtener moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN. Esta invención es de aplicación a diferentes ensayos de afinidad donde se lleve a cabo la detección de antígenos o anticuerpos de interés biológico o bien secuencias de ADN determinantes de un patógeno. Por tanto, los campos de aplicación de la presente invención se hallan en sectores muy variados como el de análisis clínicos, medio ambiente o agroalimentario.

20 Pueden utilizarse complejos de oro (I) y de oro (III). Los complejos de oro (I) que tengan en su esfera de coordinación un tiolato, como por ejemplo aurotiomalato, aurotiosulfato, auranofina, aurotioglucosa o aurotiopropanol sulfonato, son preferibles aunque no exclusivos para el marcaje de proteínas con grupos tiol o disulfuro en sus moléculas. Los complejos de oro (I) y oro (III) que contengan en su esfera de coordinación átomos como Cl o Br y ligados con uno o dos átomos N dadores, como por ejemplo el cloruro trietilfosfina oro (I), bromuro de trietilfosfina oro (I), cloruro de piridina oro(I), triclopiridina oro (III), complejos poliamínicos de oro (III) o el ion tetracloroaurato, son preferibles aunque no exclusivos para el marcaje de hebras de ADN ya que tienden a unirse al nitrógeno N7 de las guaninas o al N1/N7 de las adeninas, y al nitrógeno N3 de la citosina y timina.

30 En cuanto a la proteína a marcar puede ser cualquier molécula que pueda actuar como antígeno o anticuerpo, preferiblemente que contenga en su secuencia de aminoácidos grupos tiol o puentes disulfuro, sin que esto último sea excluyente de los casos en que estos grupos no estén presentes ya que los complejos de oro se pueden unir a otros aminoácidos como el grupo imidazol de las histidinas o los grupos amino en general aunque con menor afinidad. En cuanto a las hebras de ADN, éstas pueden ser sencillas o dobles.

40 La metodología de marcaje tanto de proteínas como de hebras de ADN con los diferentes complejos de oro consta de dos etapas: mezcla y reacción de conjugación, y purificación del conjugado obtenido.

45 La mezcla entre los complejos de oro y proteína o hebra de ADN se hace en relaciones molares proteína (o ADN): complejo de oro comprendidas entre 1:5 y 1:10000. Dicha relación depende del tipo de proteína o hebra a marcar y del tipo de complejo de oro utilizado. En algunos casos como el aurotiomalato (complejo de oro (I)) no se debe utilizar concentraciones superiores a 5.0×10^{-3} M para evitar la formación de polímeros de este complejo que eviten su reacción con la proteína o hebra de ADN.

50 La reacción de marcaje o conjugación debe ser hecha en unas condiciones de temperatura, fuerza iónica y pH cercanos a las condiciones fisiológicas, es decir, temperatura de 37°C, fuerza iónica 0.15M y pH 7.5. No es necesario que el medio de reacción esté tamponado pero se debe asegurar que durante el transcurso de la reacción no haya cambios drásticos de pH. El medio de reacción utilizado dependerá de la solubilidad del complejo de oro utilizado. El tiempo de reacción de conjugación necesario para que se complete la formación de las moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN se estima alrededor de 24 horas.

55 La etapa de purificación de las moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN una vez transcurrida la reacción de marcaje se lleva a cabo mediante diálisis utilizando membranas de diálisis cuyo tamaño de poro dependerá del peso molecular de la proteína o hebra de ADN a marcar. El objeto de esta purificación es separar la molécula marcada oro-proteína u oro-ADN del complejo de oro que ha quedado sin reaccionar dado que éste último se utiliza en exceso con respecto a la proteína o ADN. La diálisis se hace frente a una disolución idéntica a la utilizada para la reacción de marcaje pero libre de proteína o ADN y complejo de oro. La diálisis se lleva a cabo entre 24 y 48 horas renovando la disolución a la que se enfrenta dos veces.

60 Una vez purificadas las moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN se conservan a 4°C y protegidos de la luz. De esta forma en las moléculas marcadas oro-proteína y oro-ADN así formados el oro se mantiene como oro fónico y no se reduce a oro metálico.

65 En la presente invención se utiliza el método de sensibilización con plata, descrito previamente, y electrodos de carbono vitrificado de forma preferente para detectar las moléculas marcadas oro-proteína y oro-ADN que se les

hace participar previamente en una reacción de afinidad, pero se pueden utilizar otros electrodos como electrodos de pasta de carbono o electrodos serigrafiados de carbono así como otros métodos de detección electroquímicos como la redisolución anódica del oro previamente depositado en la superficie del electrodo, el método de sensibilización con mercurio o la detección cronoamperométrica de la intensidad de corriente generada por la reducción de los protones del medio catalizada por estas moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN. En realidad, cualquier método analítico basado en la detección del complejo de oro "marca" podría ser utilizado con el fin de determinar la molécula marcada, sea proteína o ADN, en un ensayo de afinidad.

El uso de complejos de oro como marca de moléculas de interés biológico y la metodología de marcaje descrita en la presente invención presentan la ventaja de que la metodología de marcaje es sencilla y no necesita ningún agente químico intermedio de enlace entre los complejos de oro y la proteína o hebras de ADN a marcar, a diferencia de lo que ocurre en otros casos en los que la marca es también un ión metálico. Otra ventaja a destacar es que las moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN obtenidos siguiendo la metodología expuesta pueden ser detectados con diferentes métodos analíticos de detección o cuantificación, resultando en muchos casos tan sensibles como cuando se utilizan enzimas como marcas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra las diferentes relaciones de marcaje del anticuerpo IgG de conejo anti-IgM humana con aurotionalato de sodio y su respuesta ante la electrodeposición catalítica de plata comparada con el caso de la BSA con marcaje 1:5.

La figura 2 muestra el esquema de la construcción del inmunosensor para la detección de inmunoglobulina M humana.

La figura 3 presenta un esquema de la construcción del genosensor para el virus del SARS.

La figura 4 muestra la respuesta del genosensor cuando se hibrida con la hebra complementaria el oligonucleótido de 30 bases que contiene una secuencia determinante del virus SARS para tres relaciones de marcaje con aurotionalato de sodio diferentes.

Ejemplos de realización de la invención

La eficacia del procedimiento se ilustra adicionalmente mediante tres ejemplos que no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

Marcaje de inmunoglobulina G de conejo con aurotionalato de sodio

Este ejemplo ilustra la metodología utilizada para marcar con aurotionalato de sodio un anticuerpo inmunoglobulina G de conejo (RIgG) anti-inmunoglobulina M humana.

El método consta de tres etapas:

1. Mezcla de disoluciones de RIgG y de aurotionalato de sodio.

Se ensayaron distintas relaciones de marcaje. Las cantidades de reactivos mezcladas, así como las concentraciones finales y la consiguiente relación de marcaje se reflejan en la tabla 1:

ES 2 303 405 B1

TABLA 1

	Concentración inicial (M)	Cantidad mezclada (μ l)	Concentración final (M)	Relación de marcaje
RIgG	1.36×10^{-4}	100	2.72×10^{-5}	1:5
Aurotiomalato	1.70×10^{-4}	400	1.36×10^{-4}	
RIgG	1.36×10^{-4}	100	2.72×10^{-5}	1:100
Aurotiomalato	3.40×10^{-3}	400	2.72×10^{-3}	
RIgG	1.36×10^{-4}	100	2.72×10^{-5}	1:1000
Aurotiomalato	3.40×10^{-2}	400	2.72×10^{-2}	
RIgG	1.36×10^{-5}	100	2.72×10^{-6}	1:10000
Aurotiomalato	3.42×10^{-2}	400	2.72×10^{-2}	

2. La reacción de conjugación para todas las relaciones de marcaje se realiza en un tubo eppendorf a 37°C durante 24 horas.

3. Purificación del producto conjugado.

La RIgG marcada con oro es separada del aurotiomalato libre mediante un sistema de diálisis. Este sistema consiste en la introducción del producto conjugado en un cassette de diálisis de 10000 MWCO, sumergida en 200 ml de una disolución de NaCl 0.15 M, cuyo pH ha sido ajustado a 7.5 con una disolución de NaOH 0.1 M. El sistema se deja dializando durante 48 horas, renovando la disolución de NaCl a las 24 horas.

El producto conjugado obtenido (RIgG-Au) se conserva a 4°C y protegido de la luz.

Para comprobar la eficacia del marcaje, las moléculas marcadas RIgG-Au así obtenidos son previamente adsorbidos en un electrodo de carbono vitrificado pretratado y se registra la señal analítica obtenida mediante la electrodeposición catalítica de plata. La metodología seguida para obtener la señal analítica es como sigue:

1. Pretratamiento electrodo. El electrodo es pulido sobre un paño impregnado en una disolución que contiene partículas de alúmina de diámetro medio inferior a 1.0 μ m. Se repite el pulido utilizando partículas de alúmina de 0.3 μ m y posteriormente se somete a sonicación. Posteriormente, el electrodo pulido, se somete a un pretratamiento electroquímico, introduciéndolo en una disolución de HCl 0.1 M y sometiéndolo a un potencial de +1.40 V durante 2 minutos, con agitación.
2. Adsorción de la RIgG-Au sobre la superficie electrodo. Una gota de 50 μ l de la disolución de proteína marcada (RIgG-Au) se coloca sobre la superficie del electrodo pretratado y se deja durante 10 minutos.
3. Acumulación de oro sobre el electrodo. Después de un lavado con una disolución de NaCl 0.15 M pH 7.5, el electrodo se introduce en una celda con 20 ml de una disolución de HCl 0.1 M y el oro, enlazado a la RIgG, es electrodepositado en la superficie electrodo aplicando un potencial de deposición de -1.0 V durante 5 minutos, con agitación.
4. Etapa de oxidación en H₂SO₄. Tras un lavado con agua, el electrodo es introducido en una celda con 20 ml de una disolución de H₂SO₄ 0.1 M y se le somete a un potencial oxidante de +1.40 V durante 1 minuto, con agitación.

ES 2 303 405 B1

5. Registro de la señal analítica. Se introduce el electrodo en una disolución de NH_3 1.0 M, conteniendo 2.0×10^{-4} M de nitrato de plata, y se le somete a un potencial de deposición de -0.14 V durante 1 minuto, transcurrido el cual se inicia el barrido de potenciales anódico hasta $+0.30$ V con una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} . Llevando a cabo este último paso, se registra el voltamperograma cíclico correspondiente a la señal analítica.

6. Etapa de limpieza de la superficie del electrodo. La etapa de limpieza consiste en introducir el electrodo en una disolución de KCN 0.1 M (preparada en NaOH 0.1 M) durante 2 minutos, en circuito abierto y con agitación.

El marcaje de RIgG se compara con otro realizado para marcar albúmina de suero bovino (BSA) con aurotiomalato de idéntica forma a como se ha llevado a cabo el de RIgG pero con una relación de marcaje de 1:5. Para ello se mezcla una alícuota de $100 \mu\text{l}$ de una disolución de 1.0×10^{-3} M de BSA con una alícuota de $900 \mu\text{l}$ de una disolución de 5.5×10^{-4} M de aurotiomalato de sodio.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1. La relación lineal obtenida para la BSA-Au (1:5) se encuentra en un intervalo de concentraciones comprendido entre 2.5×10^{-8} M y 7.5×10^{-7} M, con un coeficiente de correlación lineal de 0.9994.

Cuando se trasladan las mismas condiciones para el marcaje de RIgG con aurotiomalato de sodio (es decir, relación de marcaje 1:5), no se obtiene señal analítica. Este hecho sugiere que la afinidad de la RIgG por el oro es menor que la que tiene la BSA y, por tanto, la relación de marcaje usada no es suficiente para obtener un marcaje aceptable.

En el resto de las relaciones de marcaje ensayadas para la RIgG, la relación obtenida entre la concentración de RIgG-Au y la señal analítica es lineal.

Se puede observar que, a medida que aumenta la relación de marcaje de RIgG, aumenta la pendiente de la recta obtenida. Este hecho sugiere que al aumentar esta relación, aumenta la cantidad de oro enlazado a la molécula de RIgG. Sin embargo, en ningún caso se alcanza la pendiente obtenida para la BSA-Au (1:5), lo que ratifica la mayor afinidad de esta última molécula por el oro.

Al llegar a la relación de marcaje 1:10000, ya no se observa diferencia con lo obtenido para 1:1000, debido a que la molécula de RIgG alcanza una saturación de sus sitios de enlace.

Ejemplo 2

Uso de la inmunoglobulina G de conejo anti-inmunoglobulina M humana marcada con aurotiomalato como reactivo conjugado en un inmunosensor para la determinación de inmunoglobulina M humana

Este ejemplo ilustra la aplicabilidad del anticuerpo RIgG marcado con aurotiomalato en el desarrollo de un inmunosensor para determinar el antígeno correspondiente (inmunoglobulina M humana).

El inmunosensor se construye utilizando un electrodo de carbono vitrificado que es pretratado siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 1. Un esquema del inmunosensor se muestra en la figura 2. La relación de marcaje del anticuerpo escogido en este ejemplo es 1:1000. El anticuerpo marcado según la metodología descrita en el ejemplo 1 se le hace reaccionar durante una hora con su antígeno (inmunoglobulina M humana) que ha sido previamente adsorbido durante 15 minutos en la superficie del electrodo pretratado. La señal analítica se obtiene siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 1.

En primer lugar se ha observado el efecto que ejerce la concentración de RIgG-Au, que se hace reaccionar con la IgM inmovilizada, sobre la señal analítica. Para ello, se fijó una concentración de IgM 5×10^{-10} M, adsorbida durante 15 minutos, y un tiempo de reacción inmunológica de 60 minutos. En este caso se obtiene una relación lineal entre la concentración de RIgG-Au y el valor de la señal analítica, en un intervalo comprendido entre 5.0×10^{-9} M y 1.0×10^{-7} M de RIgG-Au, con un coeficiente de correlación lineal de 0.9985. El límite de detección obtenido, calculado como la concentración correspondiente a tres veces la desviación estándar de la estima de la ordenada en el origen, es de 4.24×10^{-9} M de RIgG-Au.

Siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, manteniendo fija la concentración de la disolución de RIgG-Au, la desviación estándar relativa del valor de la señal analítica obtenida para una concentración de IgM de 5×10^{-10} M y para 5 medidas consecutivas es de 7.9%, con una intensidad media de pico de $11.12 \mu\text{A}$.

Además para dos concentraciones de RIgG-Au distintas: 5×10^{-8} M y 1×10^{-7} M, se encontró una relación lineal entre la concentración de IgM inmovilizada sobre el electrodo y el valor de la señal analítica. Los intervalos lineales, así como los coeficientes de correlación lineal, pendientes de las rectas obtenidas y límites de detección, para ambos casos, se muestran en la tabla 2:

TABLA 2

Concentración de RIgG-Au (M)	Pendiente de la recta ($\mu\text{A/M}$)	Ordenada en el origen (μA)	Intervalo lineal (M)	Coefficiente de correlación	Límite de detección* (M)
5×10^{-8}	1.0×10^{10}	-0.23	$7.5 \times 10^{-11} - 1.0 \times 10^{-9}$	0.9980	2.79×10^{-11}
1×10^{-7}	2.0×10^{10}	0.02	$7.5 \times 10^{-11} - 5.0 \times 10^{-10}$	0.9954	5.07×10^{-11}

*L.D. calculado como la concentración correspondiente a tres veces la desviación estándar de la estima de la ordenada en el origen.

Como se puede observar, al aumentar la concentración de RIgG-Au fijada, aumenta la pendiente de la recta obtenida. Sin embargo el límite de detección no disminuye y el intervalo lineal se acorta. Esto último puede ser debido a que el electrodo alcanza su máxima señal (saturación del electrodo) a aproximadamente $11 \mu\text{A}$, y al aumentar la concentración de RIgG-Au, se alcanza esta saturación más rápidamente, es decir, para menores concentraciones de IgM.

Si comparamos estos resultados, con los obtenidos en otros trabajos (E. Abad-Villar, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, *Biosens. Bioelectronics.*, 2002, 17, 797) en los que se realiza este mismo ensayo, pero utilizando láminas de oro como electrodo de trabajo, una RIgG con una marca enzimática (fosfatasa alcalina) y una detección en un sistema de flujo, encontramos que los límites de detección de IgM son similares. Cabe resaltar este dato, ya que los inmunosensores en los que se utilizan marcas electroactivas suelen ser menos sensibles que aquellos en los que la marca utilizada es un enzima. Además, el electrodo de carbono vitrificado utilizado tiene una superficie electródica sensiblemente inferior a la de las láminas de oro, a lo que hay que sumar la gran afinidad que tienen los electrodos de oro por las proteínas, además de la mayor sensibilidad de los sistemas de flujo. Esto hace que sean aún más reseñables los bajos límites de detección alcanzados con esta marca electroactiva sobre electrodos de carbono vitrificado.

Ejemplo 3

Marcaje de una hebra con secuencia determinante del virus de SARS con aurotiomalato de sodio y su uso en un genosensor construido en la superficie de un electrodo de carbono vitrificado

Este ejemplo ilustra la metodología utilizada para marcar con aurotiomalato de sodio una hebra de ADN y el uso de la hebra en un genosensor para la detección del virus del SARS. El oligonucleótido que se marca es sintético y consta de una secuencia de 30 bases.

El método de marcaje consta de tres etapas:

1. Mezcla de disoluciones del oligonucleótido y de aurotiomalato de sodio.

Se ensayaron distintas relaciones de marcaje. Las cantidades de reactivos mezcladas, así como las concentraciones finales y la consiguiente relación de marcaje se reflejan en la tabla 3:

ES 2 303 405 B1

TABLA 3

	Concentración inicial (M)	Cantidad mezclada (μ l)	Concentración final (M)	Relación de marcaje
5				
10	1.93×10^{-5}	50	9.65×10^{-6}	1:1
	Aurotiomalato	50	9.65×10^{-6}	
15	1.93×10^{-5}	50	9.65×10^{-6}	1:5
	Aurotiomalato	50	4.82×10^{-4}	
20	1.93×10^{-4}	10	1.93×10^{-5}	1:100
	Aurotiomalato	90	1.93×10^{-3}	
25	1.93×10^{-5}	10	1.93×10^{-6}	1:1000
	Aurotiomalato	90	1.93×10^{-3}	
30	1.93×10^{-6}	10	1.93×10^{-7}	1:10000
35	Aurotiomalato	90	1.93×10^{-3}	

2. La reacción de conjugación para todas las relaciones de marcajes se realiza en un tubo eppendorf a 37°C durante 24 horas.

3. Purificación del producto conjugado.

La hebra de ADN marcada con oro es separada del aurotiomalato libre mediante un sistema de diálisis. Este sistema consiste en la introducción del producto conjugado en un tubo de minidiálisis de 3500 MWCO, sumergida en 200 ml de una disolución de NaCl 0.15 M, cuyo pH ha sido ajustado a 7.5 con una disolución de NaOH 0.1 M. El sistema se deja dializando durante 48 horas, renovando la disolución de NaCl a las 24 horas.

La molécula marcada obtenida (ADN-Au) se conserva a 4°C y protegida de la luz.

Para comprobar la eficacia del marcaje las moléculas marcadas ADN-Au así obtenidos son previamente adsorbidos en un electrodo de carbono vitrificado pretratado y se registra la señal analítica obtenida mediante la electrodeposición catalítica de plata. La metodología seguida para obtener la señal analítica es como sigue:

1. Pretratamiento eléctrico. El electrodo es pulido sobre un paño impregnado en una disolución que contiene partículas de alúmina de diámetro medio inferior a $1.0 \mu\text{m}$. Se repite el pulido utilizando partículas de alúmina de $0.3 \mu\text{m}$ y posteriormente se somete a sonicación. Posteriormente, el electrodo pulido, se somete a un pretratamiento electroquímico, introduciéndolo en una disolución de HCl 0.1 M y sometiéndolo a un potencial de +1.40 V durante 2 minutos, con agitación.
2. Adsorción del ADN-Au sobre la superficie eléctrica. Una gota de $50 \mu\text{l}$ de la disolución de hebra marcada se coloca sobre la superficie del electrodo pretratado y se deja durante 5 minutos.
3. Acumulación de oro sobre el electrodo. Después de un lavado con una disolución de NaCl 0.15 M pH 7.5, el electrodo se introduce en una celda con 20 ml de una disolución de HCl 0.1 M y el oro, enlazado a la hebra de ADN, es electrodepositado en la superficie eléctrica aplicando un potencial de deposición de -1.0 V durante 5 minutos, con agitación.

ES 2 303 405 B1

4. Etapa de oxidación en H_2SO_4 . Tras un lavado con agua, el electrodo es introducido en una celda con 20 ml de una disolución de H_2SO_4 0.1 M y se le somete a un potencial oxidante de +1.40 V durante 1 minuto, con agitación.
5. Registro de la señal analítica. Se introduce el electrodo en una disolución de NH_3 1.0 M, conteniendo 2.0×10^{-4} M de nitrato de plata, y se le somete a un potencial de deposición de -0.14 V durante 1 minuto, transcurrido el cual se inicia el barrido de potenciales anódico hasta +0.30 V con una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} . Llevando a cabo este último paso, se registra el voltamperograma cíclico correspondiente a la señal analítica.
6. Etapa de limpieza de la superficie del electrodo. La etapa de limpieza consiste en introducir el electrodo en una disolución de KCN 0.1 M (preparada en NaOH 0.1 M) durante 2 minutos, en circuito abierto y con agitación.

Parte de los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

TABLA 4

Relación de marcate de ADN-Au	Pendiente de la recta ($\mu\text{A/pg}/\mu\text{l}$)	Ordenada en el origen (μA)	Intervalo lineal ($\text{pg}/\mu\text{l}$)	Coeficiente de correlación
1:5	0.15	-1.85	10-100	0.9967
1:100	1.89	-1.36	1-10	0.9983
1:1000	1.09	5.68	0.5-10	0.9992

La relación lineal obtenida para la relación de marcate 1:5 se encuentra en un intervalo de concentraciones comprendido entre 10 y 100 $\text{pg}/\mu\text{l}$ de hebra de ADN, con un coeficiente de correlación lineal de 0.9967.

Se puede observar que cuando se aumenta la relación de marcate de la hebra de ADN de 1:5 a 1:100, aumenta la pendiente de la recta obtenida y el intervalo lineal obtenido se encuentra comprendido en un orden 10 veces menor de concentración. Este hecho sugiere que al aumentar esta relación, aumenta la cantidad de oro enlazado a la molécula de ADN. Para el caso de la relación de marcate 1:1000 en principio el intervalo lineal aumenta hacia concentraciones más bajas pero la pendiente es menor que en el caso de la relación de marcate 1:100, lo que indica que dicho intervalo está muy cerca de la saturación del electrodo. De hecho si se aumenta 10 veces más el marcate de la hebra de ADN, se obtiene para una concentración de hebra de 0.1 $\text{pg}/\mu\text{l}$ una intensidad de pico de 10.43 μA , intensidad de pico muy cercana a la que se obtiene en condiciones de saturación de la superficie del electrodo.

En cuanto a la relación de marcate 1:1 de la hebra de ADN no mostrado en la tabla 4, la saturación del electrodo se obtiene para una concentración de hebra 50 veces mayor con respecto a la relación de marcate 1:5 y 500 veces mayor con respecto a la relación de marcate 1:100.

Por tanto cuanto mayor es la relación de marcate de la hebra mayor es la señal analítica obtenida para las mismas concentraciones de hebra ensayadas y mismo tiempo de acumulación y por tanto, mayor sensibilidad.

A esta hebra marcada con diferentes relaciones de marcate se le hace hibridar con una hebra sonda complementaria adsorbida previamente en la superficie de un electrodo de carbono vitrificado, pretratado como se ha explicado antes. Para ello una gota de 50 μl de la hebra sonda de una concentración de 0.9 $\text{ng}/\mu\text{l}$ se deposita en la superficie del electrodo durante una hora y después de una etapa de lavado con una buffer de 2xSSC se le hace hibridar con la hebra marcada con aurotiomalato durante 30 minutos depositando sobre el genosensor una alícuota de 50 μl de esta hebra complementaria en una concentración determinada (disuelta en una disolución reguladora 2xSSC). La señal analítica se obtiene de idéntica forma a la explicada anteriormente. Un esquema del genosensor se muestra en la figura 3.

Utilizando este genosensor se han probado tres relaciones de marcate de la hebra de ADN del virus SARS con una concentración determinada. Los resultados se muestran en la figura 4. Se puede observar que al aumentar la relación marcate de 1:100 a 1:1000 la respuesta del genosensor es muy parecida pero para una concentración de la hebra con un marcate 1:100, que es diez veces mayor que la que está marcada con una relación de marcate de 1:1000. Es decir, al igual que pasaba con la adsorción directa de la hebra marcada en la superficie del electrodo, a mayor relación de

ES 2 303 405 B1

marcaje, mayor sensibilidad. Sin embargo, cuando se compara la relación de marcaje 1:1000 con el 1:10000, en este caso la respuesta del genosensor es similar para la misma concentración de hebra ensayada. Aunque cualquier relación de marcaje sería factible, la utilización de uno u otro dependerá de la sensibilidad requerida.

5 Utilizando una relación de marcaje de la hebra con aurotiomalato 1:1000 se ha valorado la respuesta del genosensor para diferentes concentraciones de hebra de ADN marcada pudiendo detectarse hasta 50 pg (10 pg/ μ l) de la hebra complementaria del virus del SARS marcada con aurotiomalato (1:1000). La reproducibilidad interelectrónica obtenida para una concentración de 50 pg/ μ l de hebra complementaria del virus del SARS marcada con aurotiomalato (1:1000) es del 10%, expresado en términos de desviación estándar relativa.

10

Con el marcaje descrito en este ejemplo de la invención es posible distinguir secuencias de oligonucleótidos (30 bases) que tengan tres bases diferentes a la hebra complementaria, obteniéndose una señal analítica que disminuye entre el 64 y el 45%, dependiendo de la concentración ensayada. Para una concentración de 50 pg/ μ l la señal analítica disminuye un 60%. En el caso de que la hebra ensayada tenga una base diferente, la señal analítica disminuye un 90% con respecto a la obtenida con una hebra complementaria, pero utilizando condiciones de hibridación más estrictas, es decir, cuando la hibridación se lleva a cabo en una disolución reguladora de 2xSSC de pH 7.2 que contiene un 50% de formamida.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 303 405 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de complejos de oro en estado de oxidación +1 ó +3, indistintamente, cuyo átomo de oro tiene, en su esfera de coordinación, al menos un grupo tiolato o bien uno o más átomos de cloro o bromo y uno o más ligandos con átomos de nitrógeno dadores, para marcar moléculas de interés analítico.

10 2. Uso de complejos de oro, según reivindicación 1, **caracterizado** porque las moléculas a marcar pueden ser proteínas que pueden actuar como antígenos o anticuerpos, o como hebras sencillas o dobles de ADN.

15 3. Procedimiento de marcaje de moléculas de interés analítico utilizando los complejos de oro de la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende dos fases: una primera en la que se realiza una mezcla en una relación molar proteína o ADN:complejo de oro comprendida entre 1:5 y 1:10000, en unas condiciones de reacción como pH, temperatura y fuerza iónica similares a las fisiológicas durante 24 horas y sin utilizar agentes químicos intermedios de enlace entre la proteína o ADN y el complejo de oro; y una segunda etapa de purificación mediante diálisis de las moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN.

20 4. Uso de las moléculas marcadas, obtenidas por el procedimiento de la reivindicación 3, en ensayos de afinidad o hibridación.

25 5. Uso de las moléculas marcadas, según reivindicación 4, **caracterizado** porque en los ensayos de afinidad o hibridación se puede utilizar cualquier método analítico para la detección o cuantificación de las moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN.

30 6. Uso de las moléculas marcadas, según reivindicación 5, **caracterizado** porque la detección o cuantificación de las moléculas marcadas oro-proteína u oro-ADN se lleva a cabo usando la electrodeposición catalítica de plata o mercurio o la reducción catalítica de hidrógeno.

35 7. Uso de las moléculas marcadas, según reivindicación 6, **caracterizado** porque para la electrodeposición catalítica se utilizan electrodos de pasta de carbono, de carbono vitrificado o electrodos serigrafados de carbono como transductores de la señal eléctrica y/o soportes de las correspondientes reacciones de afinidad.

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

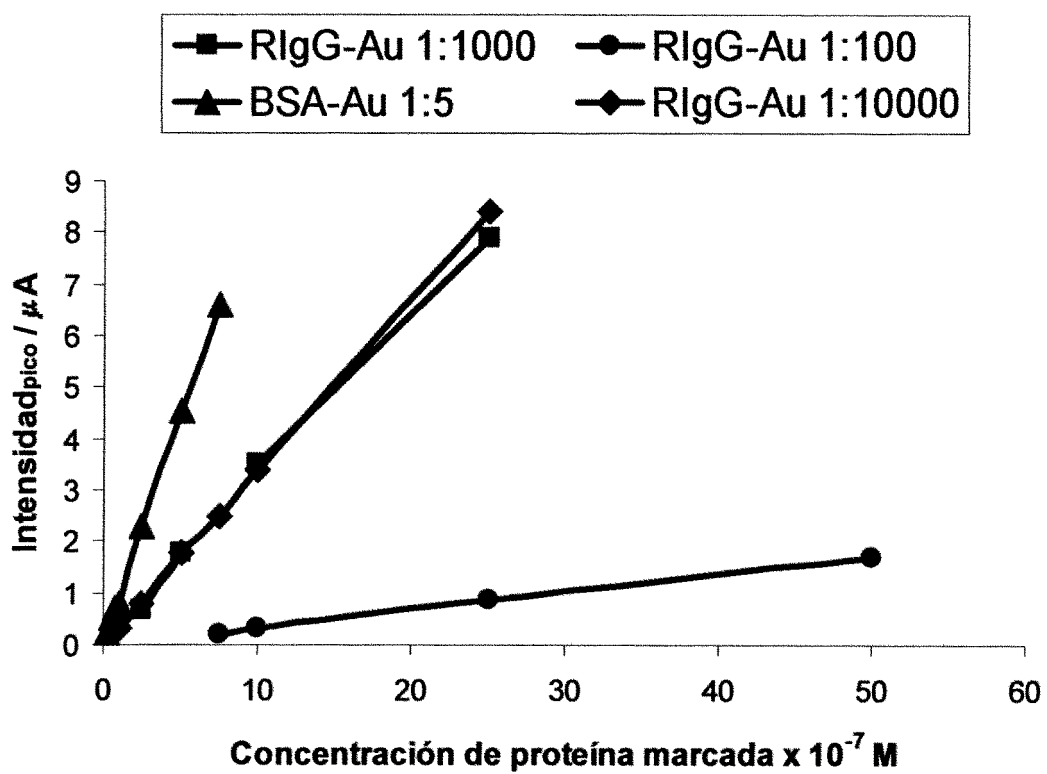


FIGURA 2

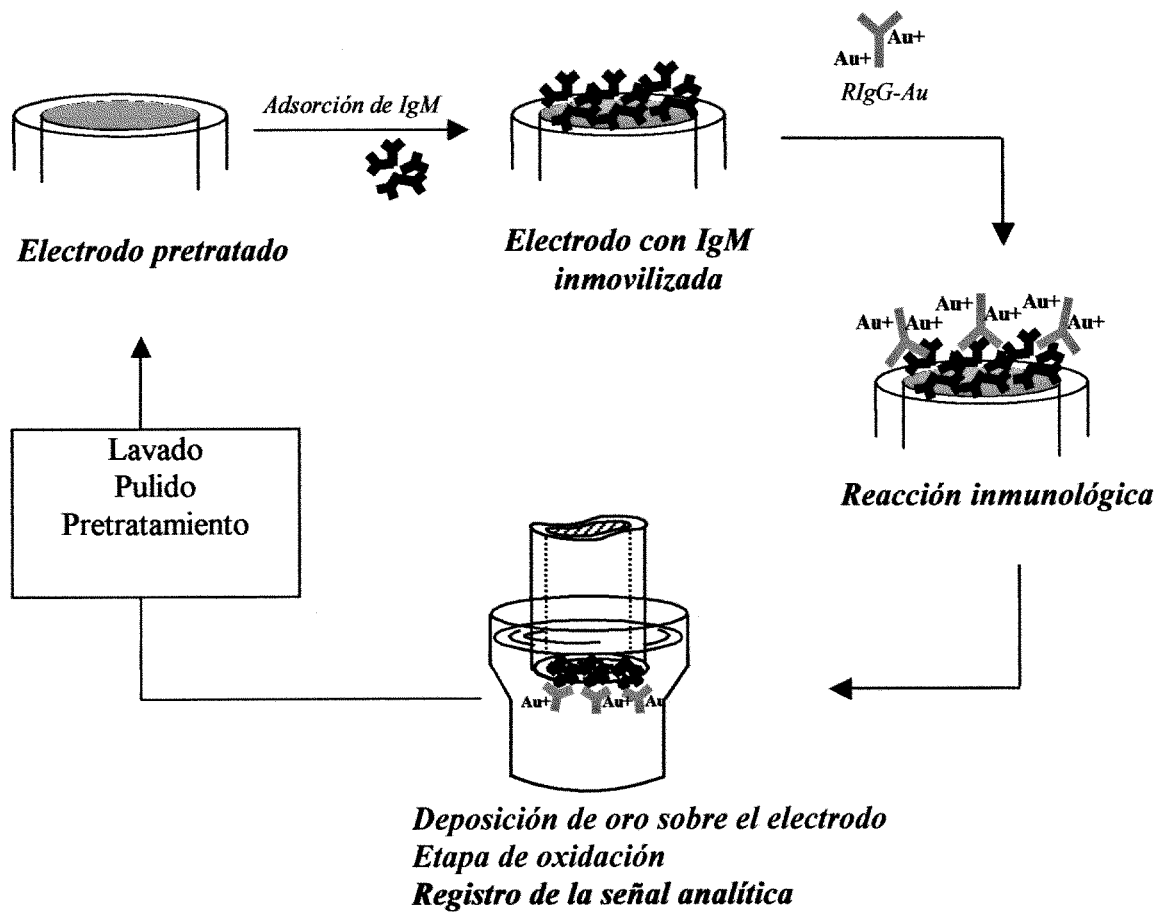


FIGURA 3

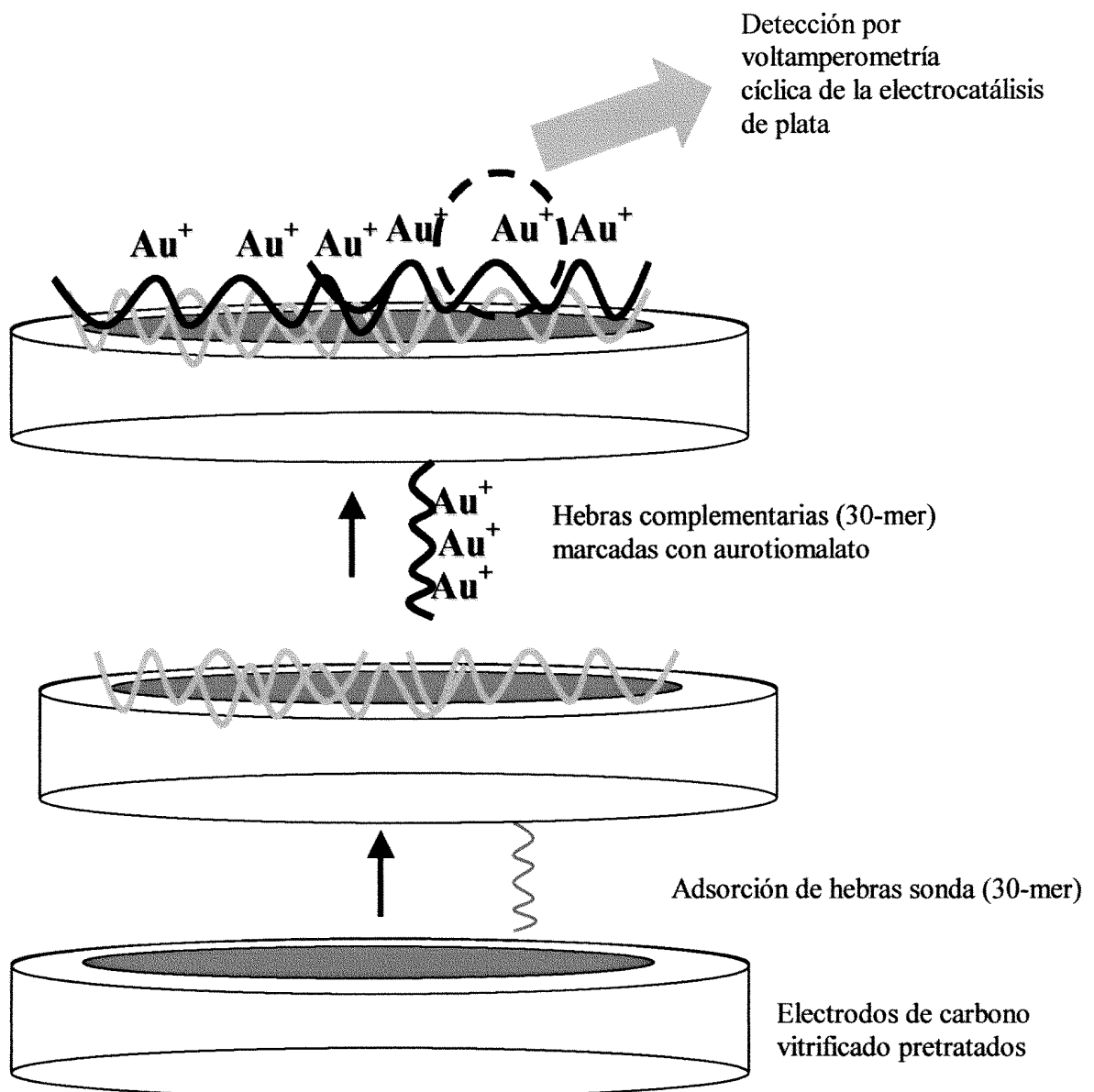
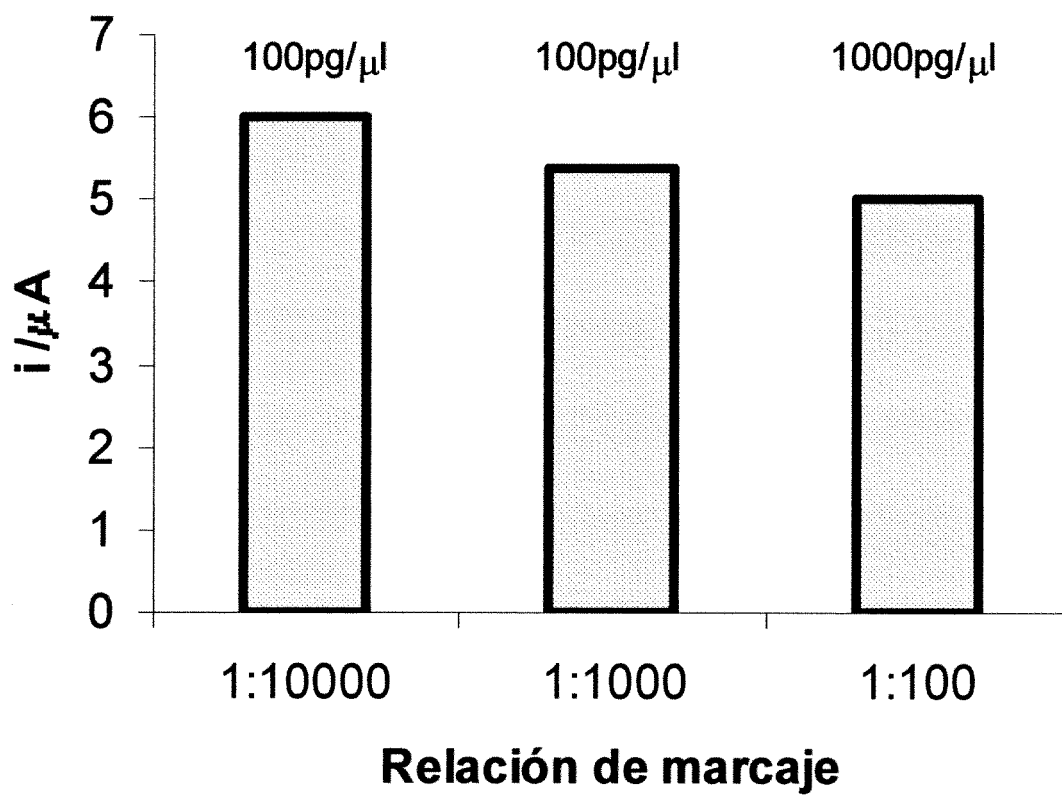


FIGURA 4





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 303 405

② N° de solicitud: 200501725

③ Fecha de presentación de la solicitud: **06.07.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** **G01N 33/68** (2006.01)
C01G 7/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ESCOSURA-MUÑIZ, ALFREDO DE LA y col. Electrocatalytic detection of aurothiomalate on carbon electrodes. Application as a non-enzymatic label to the quantification of proteins. <i>Analytica Chimica Acta</i> 25.10.2004, Vol.524, N°1-2, páginas 355-363, ISSN 0003-2670.	1-7
A	RONCONI L. y col. Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity. <i>Inorganic Chemistry</i> Marzo 2005, Vol. 44, N°6, páginas 1867-1881.	1-7
A	US 5298135 A (GEOGHEGAN et al.) 29.03.1994, columna 2, línea 50 - columna 3, línea 30.	1-7
A	US 5880149 A (GRINSTAFF et al.) 09.03.1999, columna 4, línea 27 - columna 5, línea 5.	1-7

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
07.07.2008

Examinador
M^º J. de Concepción Sánchez

Página
1/1