



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 244 310**

⑫ Número de solicitud: 200400260

⑬ Int. Cl.:
C12Q 1/28 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **03.02.2004**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2005**

Fecha de la concesión: **26.01.2007**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2007**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

⑲ Titular/es: **Universidad de Oviedo
Plaza del Riego, 4 - Edificio Histórico
33003 Oviedo, Asturias, ES**

⑳ Inventor/es: **Costa García, Agustín;
González García, María Begoña y
Fanjul Bolado, Pablo**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **3-Indoxil fosfato como sustrato de las peroxidasas.**

㉓ Resumen:

3-Indoxil fosfato como sustrato de las peroxidasas.

El 3-indoxil fosfato es oxidado en presencia de la peroxidasa de rábano silvestre (HRP) por el agua oxigenada (H_2O_2) a azul de índigo, heterociclo aromático insoluble en medio acuoso. A través de la cuantificación, previa solubilización o no, del azul de índigo, se logra medir la actividad de la peroxidasa. El hecho de que la fosfatasa alcalina y la HRP puedan utilizar el mismo sustrato enzimático (3-indoxil fosfato) y generar el mismo producto (azul de índigo) implica el empleo de la misma instrumentación analítica para la cuantificación de ambas enzimas. Esta invención resulta particularmente útil en la unificación de los reactivos e instrumentación necesaria para el desarrollo de ensayos ELISA, de aplicación al sector de los análisis clínicos.

ES 2 244 310 B1

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

DESCRIPCIÓN

3-Indoxil fosfato como sustrato de las peroxidasas.

5 Antecedentes de la invención

Las peroxidasas son un grupo de enzimas que catalizan reacciones de reducción-oxidación por ello son clasificadas como oxidorreductasas.

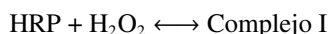
10 En su modo general de actuación, las peroxidasas reducen peróxido de hidrógeno a agua mientras oxidan una gran variedad de sustratos. Son, por tanto, oxidorreductasas que utilizan peróxido de hidrógeno como aceptor electrónico para catalizar diferentes reacciones de oxidación. El proceso es el siguiente:



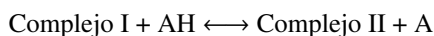
Múltiples tipos o especies de peroxidasas han sido estudiadas. Todas ellas tienen una estructura básica similar, pero en su conjunto presentan marcadas diferencias. Dentro del amplio grupo de las peroxidasas se encuentra la peroxidasa de rábano silvestre (HRP) (EC 1.11.1.7) (R.Huang, N.Hu, *Bioelectrochemistry*, 2001, 54, 75), glicoproteína con peso molecular aproximado de 44 kDa (A. Johannsson, *Principles and practice of immunoassay*, Ed. C.P.Price, D.J.Newman, Stockton Press, 1991, New York, pp. 300). En el centro activo de la HRP se encuentra ubicado un grupo hemo, donde el átomo de hierro está covalentemente unido a un átomo de nitrógeno de un resto de histidina.

25 Estudios previos han mostrado que la HRP actúa mediante un mecanismo que se desarrolla en tres etapas, del siguiente modo:

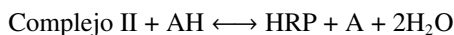
1) formación del complejo I



2) transición del complejo I al complejo II

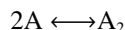


3) recuperación del enzima por reducción del complejo II



donde AH es el dador en la forma reducida y A es el dador en la forma oxidada.

4) formación del producto



La especificidad de la HRP por el sustrato para formar el complejo I es elevada y sólo el H_2O_2 , MeOOH y el EtOOH son capaces de combinarse con la HRP para generar dicho complejo I.

50 Sin embargo la especificidad del enzima (en su forma complejo I y II) por los dadores representados por AH, en las ecuaciones 2 y 3 es bastante baja. Además, existe una gran variedad de compuestos que pueden actuar como dadores. Se han utilizado una amplia gama de sustratos para este enzima aunque se pueden destacar algunos de los siguientes: antioxidantes fenólicos (S.M.Khopde, K.I.Priyadarsini, *Biophysical Chemistry*, 2000, 88, 103), compuestos como la hidroquinona y el catecol (S.Cosnier, I.C.Popescu, *Analytica Chimica Acta*, 1996, 319, 145), el ácido 1,7-dimetilúrico (R.N.Goyal, A.K.Jain, N.Jain, *J.Chem.Soc.*, 1996, 2, 1154), ácido 1-metilúrico (R.N.Goyal, M.S.Verma, N.Kumar, *Bioelectrochem.Bioenerg.*, 1997, 43, 205), p-benzoquinona (E.Casero, M.Darder, F.Pariante, E.Lorenzo, *Analytica Chimica Acta*, 2000, 403, 1), compuestos de la familia de los indoles (T.Hu, G.Dryhurst, *J.Electroanalytical Chemistry*, 1997, 432, 7), de las fenotiazinas (S.S.Razola, E.Aktas, J-C.Viré, J-M.Kauffmann, *Analyst*, 2000, 125, 79) y una multitud de variados compuestos orgánicos.

60 Una de las principales utilidades de la HRP es su capacidad para unirse como agente de marcaje a anticuerpos o hebras de ADN. De este modo y con la ayuda de algún sustrato adecuado se podrá seguir la reacción inmunológica o de hibridación en toda su extensión. Idealmente para el desarrollo de inmunoensayos con detección electroquímica se requieren sustratos no electroactivos que se transformen en productos electroactivos, que se oxiden o reduzcan a potenciales adecuados. En el caso de que sustrato y producto sean electroactivos, deben serlo a diferentes potenciales para evitar interferencias. Además, para analizar muestras biológicas es preferible utilizar potenciales inferiores a +0.5 V debido a la posible interferencia de sustancias electroactivas que se encuentren en la misma.

Entre los sustratos de la HRP que suelen ser utilizados para el revelado de ensayos de tipo ELISA se puede mencionar a la o- fenilendiamina (OPD) cuya oxidación es catalizada por la HRP generando 2,3-diaminofenazina. Se puede seguir el desarrollo de la reacción cuantificando el producto coloreado a 405 nm. El guayacol incoloro es también utilizado. Se genera tetraguayacol que es de color marrón y que se detecta a 470 nm.

Finalmente otros sustratos que se emplean para revelar esta marca pueden ser: tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidina (ODA), 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de diamonio (ABTS), 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

En la presente invención se utiliza el 3-indoxil fosfato (3-IP) como sustrato de las peroxidasas, y en concreto de la HRP. Este compuesto aromático ha sido utilizado como sustrato electroquímico de la fosfatasa alcalina por nuestro grupo de investigación, llevando a cabo la detección electroquímica del producto enzimático generado, el azul de índigo (C.F. Sánchez, A. Costa García, *Electroanalysis*, 1998, 10, 249; C.F. Sánchez, M. B. González García, A. Costa García, *Biosensors & Bioelectronics*, 2000, 14, 917).

Al añadir ácido sulfúrico concentrado sobre el azul de índigo, heterociclo aromático insoluble en medios acuosos, se consigue un proceso de sulfonación que conlleva la generación de índigo carmín. El comportamiento electroquímico de esta molécula ya ha sido estudiado (M.D. González, C.F. Sánchez, A. Costa García, *Electroanalysis*, 2002, 14, 665) con anterioridad por nuestro grupo de investigación sobre dos tipos diferentes de electrodos serigrafados comerciales, haciendo uso de varias técnicas voltamperométricas. Si se hace un barrido cíclico entre -0.4V y +0.1V de índigo carmín (generado enzimáticamente) en ácido sulfúrico 2.5 M, se observará una señal reversible a -0.15V (vs pseudo-referencia Ag).

Descripción de la invención

La presente invención es de aplicación a la determinación de la actividad de enzimas del grupo de las peroxidasas. Se basa en el empleo del 3-indoxil fosfato como sustrato de las peroxidasas y más concretamente como sustrato de la peroxidasa de rábano silvestre. Este sustrato o algún otro derivado suyo como el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato son utilizados como tales con enzimas del grupo de las fosfatasas y más concretamente con la fosfatasa alcalina. Esta invención presenta, el primer sustrato válido para la peroxidasa de rábano silvestre y para la fosfatasa alcalina, principales enzimas utilizadas como "marcas" en análisis clínicos. Esta invención resulta, por tanto, particularmente útil en la unificación de la instrumentación y reactivos necesarios para el desarrollo de ensayos ELISA.

La presente invención emplea el 3-indoxil fosfato (3-IP) como sustrato de las peroxidasas en presencia de peróxido de hidrógeno. El producto enzimático insoluble en disolución acuosa es el azul de índigo.

El 3-indoxil fosfato puede ser utilizado como sustrato tanto en forma de sal disódica preferentemente, como de sal di-p-toluidínica. Otros derivados indoxílicos como el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato (BCIP) pueden ser utilizados, en su forma de sal disódica, dipotásica o di-p toluidínica, como sustratos de la peroxidasa. El BCIP puede ser adicionado al medio de reacción en cualquier formato líquido comercial. El 5-bromo-6-cloro-3-indoxil fosfato también puede ser utilizado como sustrato de las peroxidasas, así como cualquier otro derivado indoxílico que genere un compuesto de la familia del índigo como producto de la reacción enzimática.

La catálisis enzimática tiene lugar en presencia de peróxido de hidrógeno preferentemente, aunque otros peróxidos (o precursores suyos) como el peróxido de hidrógeno de urea pueden ser también empleados. Estos reactivos peróxidos son añadidos al medio de la reacción en forma líquida o sólida.

El enzima que cataliza la reacción ha de pertenecer a la familia de las peroxidasas, independientemente de su origen. De forma preferente se utiliza la peroxidasa de rábano silvestre así como la lactoperoxidasa. El 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 producto de la catálisis enzimática es de la familia de los indigoides. Su detección se puede realizar en base a su insolubilidad en medio acuoso, preferentemente con técnicas con fundamento gravimétrico, electroquímico u óptico-espectroscópico. La detección a través de estas técnicas también se realiza previa solubilización del producto enzimático. La solubilización del índigo tiene lugar con ácidos concentrados o con disolventes orgánicos polares o apolares. Otra forma de solubilizarlo es a través de su sulfonación con la adición de ácido sulfúrico concentrado, de este modo se genera un derivado suyo denominado índigo carmín.

La reacción enzimática tiene lugar en medio acuoso y preferentemente en disolución reguladora a pH ligeramente ácido. Las disoluciones reguladoras más empleadas son de citrato y de acetato.

La reacción enzimática se lleva a cabo preferentemente a una temperatura de 37°C o a temperatura ambiente. La catálisis está favorecida por la presencia de un pequeño porcentaje (0-1%) de alguna proteína inerte como la seroalbúmina bovina.

La concentración de este reactivo así como de todos los anterior y posteriormente mencionados han de ser ajustados en cada ensayo particular. Activadores de la reacción enzimática como detergentes no fónicos (Tween 20, Triton X-100) o compuestos halogenados (p-iodofenol, p-clorofenol) pueden ser también adicionados al medio de reacción.

ES 2 244 310 B1

El 3-indoxil fosfato o sus derivados y el producto enzimático, indigo, no son agentes carcinógenos ni mutagénicos como sucede con alguno de los sustratos comúnmente utilizados con la HRP.

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 uso del 3-indoxil fosfato como sustrato para la medida de la actividad de la peroxidasa de rábano silvestre en disolución, caracterizado por la generación de azul de índigo como producto de la reacción enzimática. La detección se lleva a cabo a través de la generación de índigo carmín, tras la sulfonación del azul de índigo con ácido sulfúrico concentrado. El índigo carmín soluble en disolución acuosa es detectado electroquímicamente sobre electrodos de carbono.

La metodología empleada consta de las siguientes etapas:

- Bloqueo de la superficie del pocillo con albúmina. Para ello se añaden a cada uno de los pocillos 200 μL de una disolución reguladora PBS 10 mM de pH 7.4 (8 g/L de NaCl, 2 g/L de KCl) con un 3% de albúmina de suero bovino (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 están 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 realizará la siguiente etapa.

- Desarrollo de la reacción enzimática. Se mezclan 50 μL de una disolución de 3-indoxil fosfato 12 mM (preparada en disolución reguladora de acetato 0.1 M de pH 5.0), 50 μL de una disolución acuosa de H_2O_2 $2 \cdot 10^{-4}$ M y 8 μL de una disolución acuosa de HRP de la concentración deseada. La temperatura y el tiempo de reacción son 47°C y 30 minutos respectivamente. La reacción enzimática se lleva a cabo a pH 5.0. Durante toda esta etapa se mantiene una ligera agitación.

- Parada de la reacción y formación de índigo carmín. Se realiza con la adición de 100 μL de H_2SO_4 concentrado a cada uno de los pocillos que serán agitados durante un tiempo de 5 minutos para lograr una buena homogeneización.

- Detección del índigo carmín generado. Esta etapa puede realizarse de modos diferentes en función de la técnica empleada en la detección.

1) Voltamperometría cíclica: se hace en discontinuo, con la adición de 15 μL del contenido del pocillo deseado y 25 μL de H_2O sobre el electrodo serigrafiado de carbono. Se lleva a cabo un barrido de potenciales cíclico desde -0.4V (potencial que se mantiene durante 45 segundos) hasta +0.1V.

2) Sistema de flujo con detección amperométrica. Se introducen 100 μL 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 fluido portador H_2SO_4 1 M pasando posteriormente por la celda de medida. Durante las medidas se mantendrá un potencial constante de -0.30 V (vs electrodo de pseudo-referencia de Ag).

A través de la detección del índigo carmín generado tras la solubilización del azul de índigo se consigue cuantificar la peroxidasa de rábano silvestre. De modo muy sencillo con ayuda de un sistema de flujo y detección amperométrica se logra un límite de detección 27 pg/pocillo (0.25 ppb) de HRP. Con una detección en discontinuo y voltamperometría cíclica se obtiene un límite de detección de 32.4 pg/pocillo (0.30 ppb) de HRP.

El 3-indoxil fosfato es, por tanto, un sustrato válido para la cuantificación de peroxidasas. El 3-indoxil fosfato puede ser utilizado para la medida electroquímica de la actividad de la fosfatasa alcalina. Por tanto, ambas enzimas, principales marcas utilizadas en los inmunoensayos, pueden ser cuantificadas electroquímicamente a través del mismo producto enzimático, aunque generados bajo diferentes condiciones de reacción enzimática (pH, temperatura, tiempo de reacción).

El 3-indoxil fosfato es totalmente soluble en disolución acuosa. Este sustrato, al igual que el producto enzimático, azul de índigo, no son agentes carcinógenos ni mutagénicos como sucede con alguno de los sustratos comúnmente utilizados con la HRP.

REIVINDICACIONES

1. Uso del 3-indoxil fosfato como sustrato de las peroxidasas, **caracterizado** porque genera azul de índigo como producto enzimático.

2. Uso del 3-indoxil fosfato como sustrato de las peroxidasas o cualquier derivado indoxílico como sustrato de las peroxidasas, **caracterizado** porque genera un compuesto de la familia de los indigoides como base de la cuantificación enzimática.

3. Uso del 3-indoxil fosfato como sustrato de las peroxidasas y cualquier otro reactivo según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque genera índigo carmín como fundamento de la cuantificación enzimática.

4. Uso del 3-indoxil fosfato, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque se utiliza cualquier reactivo adicional que solubilice el azul de índigo o sus derivados.

5. Uso del 3-indoxil fosfato, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque se utiliza cualquier técnica electroquímica para la cuantificación de azul de índigo o sus derivados.

6. Uso del 3-indoxil fosfato, según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque se utiliza cualquier técnica instrumental para la cuantificación de azul de índigo o sus derivados.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 244 310

⑫ Nº de solicitud: 200400260

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 03.02.2004

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C12Q 1/28

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 0381173 A2 (ABBOTT LABORATORIES) 08.08.1990, reivindicación 2.	1-6
A	FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C. et al.: "3-Indoxyl Phosphate: an Alkaline Phosphatase Substrate for Enzyme Immunoassays with Voltammetric Detection", Electroanalysis (1998), Vol. 10, nº 4, pp.: 249-255, todo el documento.	1-6

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

08.11.2005

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1