



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 340 020**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/32 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01100642 .6**
(96) Fecha de presentación : **11.01.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1120468**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2001**

(54) Título: **Soluciones de coenzimas estabilizadas y su uso para la determinación de deshidrogenasas o bien sus sustratos.**

(30) Prioridad: **15.01.2000 DE 100 01 529**

(73) Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.05.2010

(72) Inventor/es: **Zielenski, Ralf**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.05.2010

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 340 020 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Soluciones de coenzimas estabilizadas y su uso para la determinación de deshidrogenasas o bien sus sustratos.

5 La invención se refiere a soluciones acuosas estabilizadas de un coenzima para enzimas que llevan hidrógeno así como a su utilización para determinar un analito correspondiente (sustrato) en forma reducida o a la actividad enzimática de una deshidrogenasa correspondiente. La solución estabilizada contiene un compuesto orgánico o las sales respectivas con un valor de pKa entre 1,5 y 6,0 y/o un derivado de hidroxilamina.

10 La determinación de las actividades enzimáticas (o de las concentraciones de sustrato), en particular en suero sanguíneo o en plasma tiene un importante papel en el diagnóstico clínico químico. Frecuentemente se emplean para ello métodos analíticos que se basan en la reducción de la Nicotinamida-adenin-dinucleótido ("NAD") o bien Nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato ("NADP") y en el registro fotométrico del cambio que ha tenido lugar en el comportamiento de la absorción en el campo de longitudes de onda ultravioleta ($\lambda=334, 340$ o 365 nm). Al elegir
15 las condiciones de prueba adecuadas este cambio es linealmente proporcional a la actividad enzimática que se va a determinar (o bien a la concentración de sustrato).

Para determinar la actividad enzimática de la lactatodeshidrogenasa (LDH, E.C.1.1.1.127) se recomienda hoy en día el método descrito en Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 31, 897 (1994) y Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 32, 639 (1994). El principio de análisis prevé la oxidación de lactato a piruvato bajo la reducción simultánea de un coenzima como el NAD o NADP a NADH o NADPH. Dicha reacción - como aquí por ejemplo la catalizada por LDH - tiene lugar en un medio alcalino (pH 9,4). Esta inestabilidad se exterioriza en un aumento moderadamente rápido de la extinción (del llamado valor blanco reactivo), en un margen de longitudes de onda correspondiente a la medición, de manera que transcurrido poco tiempo (3 meses) incluso en el almacenamiento en frío (2 hasta 8°C) la combinación
25 de reactivos es inútil. Este problema se plantea en especial para la fabricación de reactivos líquidos estables durante largo tiempo, preparados para el uso, que deben facilitar al usuario una realización a ser posible segura y simple de los análisis en la rutina diaria.

De la JP 84/82398 se conoce un método para la estabilización de coenzimas acuosos, utilizando formadores de
30 quelatos y azidas. Sin embargo, el inconveniente de este método es que se requiere la adición de azida y el anión azida se ha clasificado como cancerígeno en la actualidad y además tiene un efecto inhibitor de muchas enzimas.

Se sabe además como estabilizar soluciones de coenzimas mediante la adición de sales de metales pesados, por ejemplo, en forma de iones de cobre (II) y de este modo contrarrestar un incremento del valor del blanco de reactivos
35 (DE 195 43 493 o bien EP 0 804 610) Para un periodo de almacenamiento más largo o bien para temperaturas de almacenamiento superiores (incluso a partir de 10°C) se pueden formar productos de degradación que inhiban la enzima deshidrogenasa que se va a determinar y por tanto produzcan valores de medición inferiores. Un reactivo estabilizable durante un periodo de tiempo largo (3 y más meses) con una calidad uniforme, donde entre otras cosas se puedan evitar las calibraciones reiteradas, no se encuentra disponible en la actualidad.

40 La presente invención tiene por tanto el cometido de conseguir un reactivo líquido estable mejorado que presente un coenzima para enzimas transmisores de hidrógeno, que sea adecuado para la determinación de la actividad de la deshidrogenasa o del sustrato correspondiente.

45 El cometido se resuelve mediante una solución acuosa conforme a la reivindicación 1. Como grupos alquilo son especialmente adecuados aquellos radicales que presentan uno hasta diez átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden ser de cadena lineal o ramificada. Los grupos arilo pueden ser grupos fenilo sustituidos o no sustituidos, si fuera preciso enlazados por un grupo alquenoilo, que puede presentar uno hasta 8 átomos de carbono. En particular son especialmente adecuados los compuestos de nitrógeno de la fórmula (I) ya conocida, es decir, derivados de hidroxilamina como la hidroxilamina, O- o N-alquilhidroxilamina con uno hasta seis átomos de carbono o bien la O-benzilhidroxilamina y las sales derivadas de la misma, como por ejemplo, sulfatos, fosfatos o sales de amonio. Los derivados de hidroxilamina correspondientes se caracterizan además por una acción complejante frente a los productos de degradación del coenzima.

55 La estabilidad de las soluciones se puede mejorar además cuando se añade un formador de complejos, es decir un ligando, que presenta dos o más puntos o lugares de coordinación. Pueden darse ligandos bidentados, como por ejemplo la etilendiamina y ligandos polidentados, como la etilendiamina-N, N, N, el ácido tetraacético (EDTA) o las sales correspondientes, en particular la sal disódica, el éter corona o los criptandos. Lo que equivale a una concentración del formador de complejos de aproximadamente 0,5 hasta 30 mM, preferiblemente 1,0 hasta 5,0 mM.

60 Los compuestos orgánicos adicionados conforme a la invención o las sales derivadas de los mismos con un valor de pKa entre 1,5 y 6,0 son aquellos ácidos orgánicos, que disponen de más de un efecto complejante y una acción amortiguadora en el margen de pH entre 1,0 y 7,0, como el ácido cítrico y las sales solubles en agua derivadas del mismo.

65 Las concentraciones de los compuestos orgánicos, sales o derivados de hidroxilamina adicionados pueden variar en límites amplios, es decir entre 0,001 y 1,0 M. Una concentración de aprox. 5 hasta 200 mM para el ácido cítrico o el citrato puede ser especialmente adecuada. En numerosos casos concentraciones de aprox. 50 mM de ácido cítrico

ES 2 340 020 T3

o citrato producían el efecto deseado. El margen de concentración preferido para el derivado de hidroxilamina que se ha añadido conforme a la invención en presencia de un compuesto orgánico con un valor de pKa correspondiente se sitúa entre 2 y 300 mM. El valor del pH de la solución acuosa estabilizada puede oscilar entre 1,0 y 7,0, de forma que el valor del pH se ha comprobado que preferiblemente se encuentra entre 2,0 y 4,0 o bien alrededor de 3,0.

Se ha comprobado que lo más preferible es que un derivado de hidroxilamina al que se ha añadido una sal de citrato se encuentren en un reactivo que contiene NAD o NADP y si fuera preciso, en otro reactivo que contenga un analito transmisor de hidrógeno, que contenga además sustratos y sustancias auxiliares, además de ácido bórico o una sal de borato, para la determinación del tampón correspondiente, como por ejemplo, N-metilglucamina (MEG). Para esta configuración sirven también los datos de concentración ya indicados. Además se ha comprobado que se prefieren aprox. 20 hasta 200 mM de citrato o ácido cítrico y aprox. 10 hasta 150 mM del derivado de hidroxilamina correspondiente. Para el derivado de ácido bórico que se ha añadido a la solución de sustrato que no contiene NAD/NADP (llamado reactivo 1) se ha comprobado que lo apropiado es un margen de concentración entre 50 y 200 mM.

Como tampón son adecuadas aquellas sustancias para el reactivo que contiene el sustrato, que presentan una buena capacidad amortiguadora entre un pH de 8,5 y 10,0, como por ejemplo, los llamados buenos tampones (tricina, bicina, TAPS, AMPSO, CHES, CAPSO, AMP, CAPS), carbonatos de iones de metales alcalinos, MEG, TRIS así como tampón fosfato. También se ha comprobado que las mezclas de las llamadas sustancias tampón son muy adecuadas. Lo preferido es que la concentración tampón oscile entre 10 y 1000 mM, preferiblemente entre 200 y 600 mM. En la solución tampón alcalina (reactivo 1), que fija el valor del pH de trabajo se ha comprobado que lo preferible es la adición de ácido bórico o de sus sales y derivados solubles. La concentración de los componentes de ácido bórico correspondiente se sitúa entre 50 y 200 mM, preferiblemente alrededor de 100 mM.

Como coenzimas en el sentido de la presente invención se tienen en cuenta el NAD o el NADP, pero también los coenzimas modificados, como por ejemplo tioNAD(P) o NHxDP (= nicotinamidahipoxantina-dinucleótidosfosfato). Los coenzimas pueden presentarse en una concentración de aproximadamente 1,0 hasta 100 mM en la cubeta de reacción, preferiblemente en un margen de 5,0 hasta 15,0 mM.

Las soluciones de coenzimas estabilizadas conforme a la invención se emplean en forma de soluciones acuosas. El reactivo preparado para ello es estable también como granulado, mezcla en polvo así como liofilizado durante un periodo de tiempo amplio. Se ha podido constatar que no existen síntomas de descomposición del reactivo a temperaturas de 2 hasta 8°C en un periodo de tiempo de 15 meses. Se ha podido demostrar que bajo una carga, es decir a una temperatura de aproximadamente 35°C durante 2 semanas o bajo un tratamiento a 42°C durante cinco días, la solución se mantiene estable con uno o varios aditivos conforme a la invención.

Otro objetivo de la invención es un método para la determinación de un analito transmisor de hidrógeno o bien de una deshidrogenasa correspondiente en presencia de un coenzima que absorbe hidrógeno, donde el coenzima se presenta en una solución acuosa estabilizada tal como se ha descrito antes.

La determinación se lleva a cabo preferiblemente en muestras de origen biológico como, por ejemplo, sangre entera, suero o plasma o bien otras fuentes animales o humanas o en extractos vegetales. La muestra se puede preparar con solución salina fisiológica. Como valor de control sirve en dicho caso una solución de NaCl al 0,9%.

Para el caso de que se deba determinar la actividad enzimática de una deshidrogenasa como, por ejemplo, la lactatodeshidrogenasa, se emplea una solución de sustrato, por ejemplo, una solución de lactato, en una sustancia (mezcla) tamponada a aproximadamente pH 9,4 (37°C). El sustrato se puede emplear pues en las concentraciones habituales conocidas por el experto, preferiblemente en un intervalo de 40 hasta 80 mM.

Para la determinación de un analito transmisor de hidrógeno como por ejemplo el lactato, se ha propuesto la correspondiente deshidrogenasa, como por ejemplo la LDH en una sustancia tamponada entre pH 8,5 y 20,0. En general, es suficiente con una cantidad de deshidrogenasa del orden de 70 hasta 500 U/l, preferiblemente de 110 hasta 220 U/l. La determinación se realiza normalmente a unos 37°C.

Además del lactato mencionado como ejemplo se puede determinar de forma similar el glutamato o amoníaco, alcoholes, glicerinaldehído-3-fosfato, glucosa o bien otros parámetros, los cuales pueden ser modificados por una deshidrogenasa adecuada dependiente del coenzima. Lo mismo sirve para determinar la actividad enzimática de dichas deshidrogenasas.

Otro objetivo de la invención es un kit o equipo de pruebas para realizar la determinación del analito o enzima. El equipo consta básicamente de dos reactivos. El primer reactivo contiene - para el caso de la determinación de la actividad de una deshidrogenasa - un analito (sustrato) transmisor de hidrógeno en un sistema tapón adecuado entre pH 8,5 y 10,0. El segundo reactivo contiene un enzima para los enzimas transmisores de hidrógeno, como por ejemplo el NAD o NADP, así como un compuesto orgánico con un valor de pKa entre 1,5 y 6,0 y/o un derivado de hidroxilamina conforme a la invención. Además el segundo reactivo puede contener otras sustancias auxiliares, como por ejemplo, sales de metales pesados o un formador de complejos. Lo mismo ocurre para la determinación del analito o del sustrato, como por ejemplo de lactato.

ES 2 340 020 T3

Abreviaciones

AMP = 2-amino-2-metil-1-propanol

AMPSO = 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietil)amino-2-hidroxi-propanosulfónico]

Bicina = N,N-bis(2-hidroxietil)glicina

CAPS = 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico

CAPSO = 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propanosulfónico

CHES = 2-(N-ciclohexilamino)-etanosulfónico

MEG = N-metilglucamina

TAPS = N-tris-(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico

Tricina = N-tris(hidroximetil)metilglicerina

TRIS = 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanol

Los ejemplos siguientes aclaran la invención:

Ejemplo 1

Reactivo 1: N-metilglucamina 390 mmol/l, pH 9,4(37°C); lactato L de litio 60 mmol/l.

Reactivo 2: NAD(P) 60 mmol/l como liofilizado, mezcla en polvo, granulado o solución acuosa.

Temperatura de incubación: $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Longitud de la longitud de onda 340 ± 2 nm; capa de grosor 7 mm;

Incubación previa: 5 minutos; fase lag: 2 minutos; tiempo de medición: 2 minutos

Reactivo 1 = 250 μl ; Reactivo 2 = 50 μl ; Muestra = 7 μl de solución de NaCl (0,9% p/v)

Se realizan las siguientes determinaciones (IFCC: referencia reconocida para la determinación del lactato que contiene LDH, NAD/NADH y N-metilglucamina, pH 9,4; Eur. J.Clin.Chem. Biochem. vol. 32, p.63 9-655(1994), tabla 1:

TABLA 1

Reactivo 1	Reactivo 2	Valor blanco (LW) no cargado (mE/min)	Valor blanco (LW) 5 días 42°C (mE/min)	Señal calibrador-LW no cargado (mE/min)	Señal calibrador-LW 5 días 42°C (mE/min)
IFCC + 100 mmol/l borato	IFCC	1,3	6,3	32,4	31,0 = 95,7%
IFCC	IFCC + 100 mmol/l citrato pH 3,0	2,1	6,2	35,2	33,4 = 95,4%
IFCC + 100 mmol/l borato	IFCC + 100 mmol/l citrato pH 3,0	2,1	6,2	35,2	33,4 = 95,4%
IFCC	IFCC + 50 mmol/l hidroxilamina	0,9	3,2	34,4	33,8 = 98,3%

ES 2 340 020 T3

5	IFCC + 100 mmol/l borato	IFCC + 50 mmol/l hidroxilamina	0,7	1,8	31,1	30,5 = 98,0%
10	IFCC + 100 mmol/l borato	IFCC + 50 mmol/l hidroxilamina + 100 mmol citrato pH 3,0	0,7	1,2	29,8	30,3 = 101,7%
15	IFCC (tecnología actual)	IFCC	1,5	11,5	35,7	33,7 = 94,5%
20	Resultado: La fórmula conforme a la invención con los aditivos correspondientes en reactivo parcial 1 y/o reactivo parcial 2, en particular bajo la carga (5 días 42°C) frente al método de referencia IFCC una mejoría clara del valor blanco, hasta casi un valor blanco del calibrado no alterado.					

Ejemplo 2

Se emplean las soluciones de partida tal como se ha descrito en el ejemplo 1 y se procede del modo correspondiente. Al reactivo 2 se añadía citrato y/o diferentes derivados de hidroxilamina en distintas concentraciones y combinaciones (tabla 2).

TABLA 2

Reacti vo 1	Reactivo 2	Valor blanco (LW) no cargado (mE/min)	Valor blanco (LW) 5 días 42°C (mE/min)	Señal calibrador- LW no cargado (mE/min)	Señal calibrador- LW 5 días 42°C (mE/min)
IFCC = Refere ncia	IFCC = Referencia	0,1	10,7	35,7	32,9 = 92,1%
IFCC	IFCC+20 mmol/l Citrato+50 mmol/l Sulfato de hidroxilamina	0,8	2,5	31,6	31,2 = 98,7%
IFCC	IFCC+20 mmol/l Citrato+50 mmol/l Fosfato de hidroxilamina	0,6	1,7	30,9	30,2 = 985,1%
IFCC	IFCC+20 mmol/l Citrato+50 mmol/l O-benzilhidro- xilamina	-0,9	-0,6	34,8	33,3 = 95,7%
IFCC	IFCC + 20 mmol/l citrato + 50	-0,7	0,0	35,2	33,6 = 95,5%

ES 2 340 020 T3

	mmol/l O-metil hidroxilamina				
5	IFCC	IFCC + 20 mmol/l citrato + 50 mmol/l hidroxilamina	4,9	11,1	34,6
10					34,6 = 100,0%
Resultado: Conjunto de compuestos o sales que se añaden al reactivo 2 conforme a la invención y dan lugar a un valor mucho más bueno frente al reactivo IFCC tras una carga (5 días, 42°C).					

Ejemplo 3

Además se ha demostrado que aparecen isoenzimas distintos en la fórmula conforme a la invención. Este hecho debe corresponder a los valores hallados en la admitida recomendación IFCC (tabla 3).

Las determinaciones se realizaban con el reactivo IFCC descrito en el ejemplo 1 en comparación al reactivo conforme a la invención.

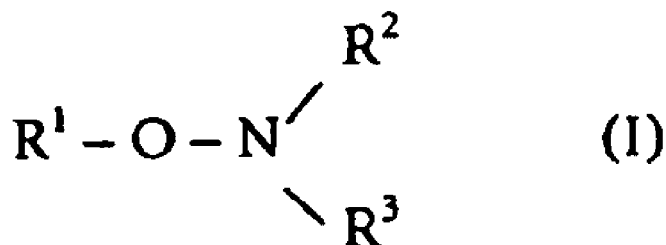
TABLA 3

Reactivo 1	Reactivo 2	Actividad isoenzima -1 (U/l)	Actividad Isoenzima-2 (U/l)	Actividad Isoenzima-3 (U/l)	Actividad Isoenzima-4 (U/l)	Actividad Isoenzima-5 (U/l)
IFCC	IFCC	536	528	735	325	382
IFCC + 100 mmol/l borato	IFCC+50 mmol/hidroxilamina+100 mmol/l citrato pH 3,0	536	523	736	301	368
Resultado: El valor hallado de los cinco isoenzimas LDH se ha podido demostrar con el reactivo conforme a la invención.						

Las modificaciones mencionadas son tenidas en cuenta en la fórmula por lo que se puede disponer de un reactivo líquido LDH que se mantendrá estable durante el almacenamiento (>12 meses) y en el transporte (incluso a temperaturas >8°C). Las ventajas para el usuario derivadas de todo ello se dan a conocer o se deducen de la descripción realizada.

REIVINDICACIONES

1. Solución acuosa estabilizada de un coenzima para enzimas transmisores de hidrógeno, que se **caracteriza** por que la solución de NAD, NADP o de un derivado correspondiente en forma oxidada o reducida así como de uno o varios compuestos orgánicos o sales correspondientes consta de un valor pKa entre 1,5 y 6,0 y de ácido cítrico o de sal de citrato y de un compuesto de nitrógeno de fórmula general (I)



donde el radical R^1 es hidrógeno, un grupo alquilo o arilo saturado o insaturado y los radicales $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$.

2. Solución estabilizada conforme a la reivindicación 1, que se **caracteriza** por, que como compuesto orgánico contiene un ácido o una sal correspondiente con un efecto amortiguador en el margen de pH de 1,0 hasta 7,0.

3. Solución estabilizada conforme a la reivindicación 1 ó 2, que se **caracteriza** por, que contiene aproximadamente 5 hasta 500 mM de ácido cítrico o sal de citrato.

4. Solución estabilizada conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 3, que se **caracteriza** por, que el valor del pH de la solución se encuentra entre 1,0 y 7,0.

5. Solución estabilizada conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 4, que contiene un hidroxilo-, O- o N-alquilhidroxil-, O-benzilhidroxilamina.

6. Solución estabilizada conforme a la reivindicación 5, que se **caracteriza** por, que contiene un derivado de hidroxilamina en una concentración entre 2 y 300 mM.

7. Método para la determinación de un analito transmisor de hidrógeno o de una deshidrogenasa en presencia de un coenzima que absorbe hidrógeno, que se **caracteriza** por que el coenzima se encuentra en una solución acuosa estabilizada conforme a las reivindicaciones 1 hasta 6.

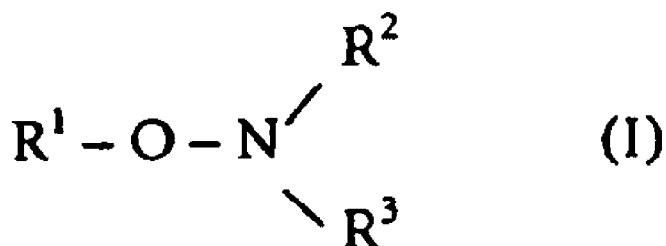
8. Método para la determinación conforme a la reivindicación 7, que se **caracteriza** por que el analito lactato, glutamato, amoníaco, alcohol, gliceraldehído-3-fosfato o glucosa se determina en presencia de un lactato-, glutamato-, alcohol-, glicerina-3-fosfato o glucosa-deshidrogenasa.

9. Método conforme a una de las reivindicaciones 7 ó 8, que se **caracteriza** por que el valor del pH se sitúa entre 8,5 y 10,0 y la concentración final de la sal de citrato y/o del derivado de hidroxilamina se sitúa entre 2 y 50 mM.

10. Kit o equipo para la determinación de un analito transmisor de hidrógeno en una muestra que consta de los siguientes componentes:

- un primer reactivo, que contiene una deshidrogenasa en un sistema tamponado a un pH adecuado entre 8,5 y 10,0, y

- un segundo reactivo conforme a la reivindicación 1, que contiene un coenzima para un enzima transmisor de hidrógeno y un compuesto orgánico con un valor pKa entre 1,5 y 6,0 y ácido cítrico o sal de citrato y un compuesto de nitrógeno de fórmula general (I)



ES 2 340 020 T3

donde el radical R^1 es hidrógeno, un grupo alquilo o arilo saturado o insaturado y los radicales $R^2 = R^3 = H$.

11. Kit o equipo para la determinación de la actividad enzimática de una deshidrogenasa en una muestra que consta de los siguientes componentes:

- un primer reactivo, que contiene un analito transmisor de hidrógeno en un sistema tamponado a un pH adecuado entre 8,5 y 10,0, y

- un segundo reactivo conforme a la reivindicación 1, que contiene un coenzima para un enzima transmisor de hidrógeno y un compuesto orgánico con un valor de pKa entre 2,0 y 4,0 y ácido cítrico o sal de citrato y un derivado de hidroxilamina de fórmula general (I) conforme a la reivindicación 10.

12. Kit o equipo conforme a una de las reivindicaciones 10 ó 11, que se **caracteriza** por que el segundo reactivo contiene ácido cítrico, una sal de citrato y un derivado de hidroxilamina.

13. Kit o equipo conforme a las reivindicaciones 10 hasta 12, que se **caracteriza** por que el segundo reactivo presenta un valor de pH entre 1,0 y 7,0.

14. Kit o equipo conforme a una de las reivindicaciones 10 hasta 13, que se **caracteriza** por que el segundo reactivo presenta un valor de pH de aproximadamente 3,0.

15. Kit o equipo conforme a una de las reivindicaciones 10 hasta 14, que se **caracteriza** por que contiene aproximadamente de 5 hasta 200 mM de una sal de citrato y/o 2 hasta 300 mM de un derivado de hidroxilamina en un primero o segundo reactivo.