

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 110 910**

② Número de solicitud: 9502332

⑤ Int. Cl.⁶: C12Q 1/42

C12Q 1/32

C12Q 1/26

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **27.11.95**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.98**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.02.98**

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta, s/n
Edif. Convalecencia 3ª planta
30003 Murcia, ES

⑦ Inventor/es: **García Carmona, Francisco;**
Valero Ruiz, Edelmira;
Bru Martínez, Roque y
Sánchez Ferrer, Alvaro

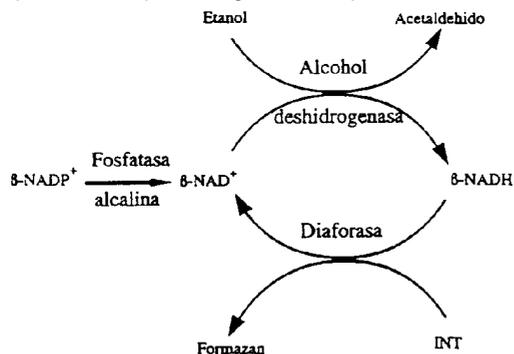
⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤ Título: **Método para la amplificación de reacciones enzimáticas basado en el acoplamiento a sistemas enzimáticos cíclicos (SEC).**

⑤ Resumen:

Método para la amplificación de reacciones enzimáticas basado en el acoplamiento a sistemas enzimáticos cíclicos (SEC).

Comprende el acoplamiento de la reacción de desfosforilación del β -NADP⁺ por acción de la fosfatasa alcalina con el SEC alcohol deshidrogenasa/diaforasa representado por el siguiente esquema de reacción:



Aplicación en las determinaciones analíticas basadas en fosfatasa alcalina por ejemplo, técnicas ELISA y otros inmunoensayos enzimáticos.

ES 2 110 910 A1

DESCRIPCION

Método para la amplificación de reacciones enzimáticas basado en el acoplamiento a sistemas enzimáticos cíclicos (SEC).

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico del análisis cuantitativo de metabolitos o actividades enzimáticas.

10 Más concretamente, en la presente invención se proporciona un método para la amplificación de reacciones enzimáticas basado en el acoplamiento a sistemas enzimáticos cíclicos (SEC) que permite la detección fiable de cantidades muy pequeñas de metabolitos o microcantidades de un enzima en un extracto de un material biológico.

15 **Estado de la técnica anterior a la invención**

Los sistemas enzimáticos cíclicos (SEC) surgen de la necesidad de incrementar la sensibilidad en las determinaciones de cantidades muy pequeñas de metabolitos [(1) Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Schulz, D.W. y Rock M.K. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 2746-2755]. Estos se basan en el reciclado in situ del metabolito en cuestión mediante dos reacciones enzimáticas opuestas, de manera que su concentración permanece constante, a la vez que otros productos de las reacciones enzimáticas se acumulan.

Los SEC también se usan para medir bajos niveles de actividad de una enzima dada [(2) Lowry, C.V., Kimmey, J.S., Felder, S. y col. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 8269-8277; (3) Lowry, O.H., Berger, S.J., Carter, J.G. y col. (1983) *J. Neurochem.* 41, 994-1010; (4) Chi, M.M.Y., Manchester, J. K., Yang, V. C., Curato, A. D., Strickler, R. C. y Lowry, O.H. (1988) *Biol. Reprod.* 39, 295-307; (5) Stephon, R. L., Neidbala, R. S., Schray, K. J. y Heindel, N. D. (1992) *Anal. Biochem.* 202, 6-9]. Estos métodos son muy sensibles y útiles para determinar microcantidades de una enzima en un extracto de un material biológico, sin embargo los ensayos desarrollados son normalmente indirectos: en primer lugar se genera el metabolito reciclable por acción de la enzima a determinar o a través de reacciones acopladas subsiguientes, y a continuación la cantidad generada de dicho metabolito se evalúa mediante un SEC. [(6) Passonneau, J.V. y Lowry, O.H. (1993) en *Enzymatic Analysis. A practical Guide* (Passonneau, J.V. y Lowry, O.H., eds.) pp. 229-305, Humana Press, New Jersey, USA]. Este tipo de procedimientos discontinuos son lentos y laboriosos y requieren un control preciso en la manipulación de las reacciones para asegurar una proporcionalidad fiable entre la formación de producto y la cantidad de enzima en la muestra problema.

Este inconveniente se evita cuando la enzima problema está acoplada a un sistema enzimático lineal (SEL) de reacciones que transforman su producto en una sustancia fácilmente detectable a bajas concentraciones, gracias a que se dispone de una solución matemática [(7) McClure, W.R. (1969) *Biochemistry* 8, 2782-2786; (8) Easterby, J.S. (1973) *Biochem. Biophys. Acta* 293, 592-597; (9) Easterby, J.S. (1984) *Biochem. J.* 219, 843-847; (10) García-Carmona, F., García-Cánovas, F. y Lozano, J.A. (1981) *Anal. Biochem.* 113, 286-291] que permite establecer las relaciones entre acumulación del producto final y nivel de la enzima problema. No obstante, el SEL no permite amplificar la señal puesto que la acumulación del producto final es solo proporcional a la transformación de sustrato inicial.

El análisis matemático del acoplamiento a un SEC no ha sido desarrollado, y éste constituirá la herramienta necesaria para la determinación continua del progreso de una reacción enzimática de interés, y por tanto para la determinación de los niveles de enzima en un único ensayo continuo.

50 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado se refiere a un método para la amplificación de reacciones enzimáticas basado en el acoplamiento a sistemas enzimáticos cíclicos (SEC).

A continuación se expone el fundamento matemático en el que se basa el método de la presente invención.

60 Para ello, se toma como referencia la figura 1 en la que se muestra el esquema de trabajo, donde la enzima de interés (E1) cataliza la transformación de X en Y, e Y es regenerado en un ciclo que transcurre entre Y y Z por acción del par de reacciones opuestas catalizadas por las enzimas E2 y E3. La acción de E2 y E3 implica la acumulación de sendos productos P1 y P2 a partir de sus respectivos sustratos S1 y

ES 2 110 910 A1

S2. Dado que Y actúa como un catalizador del SEC, P1 y P2 se acumulan exponencialmente respecto de los niveles de E1, con su consiguiente amplificación.

Considerando el esquema de la figura 1, para la condición de concentración de X saturante, la velocidad de la reacción (1), V_1 es constante. Además, se establece que las concentraciones de S1 y S2 son lo bastante altas como para ser saturantes para sus respectivas enzimas, E2 y E3, durante el tiempo de ensayo.

Bajo estas condiciones y con actividades relativamente altas de E2 y E3, una pequeña cantidad de Y sintetizado a partir de X puede catalizar la formación de grandes cantidades de los productos P1 y P2, por tanto el SEC actúa como amplificador químico de la reacción a la cual se acopla, la catalizada por E1.

Durante el reciclado, las concentraciones de Y y Z deben ser claramente inferiores a sus respectivas constantes de Michaelis-Menten (K_{mY} y K_{mZ} para E2 y E3 respectivamente), de modo que las velocidades de reacción de los pasos (2) y (3) sean proporcionales a las concentraciones de Y y Z respectivamente.

Teniendo en consideración las anteriores restricciones, que se resumen en la siguiente Tabla 1:

TABLA 1

Condiciones operativas de un SEC

Variable	Condición
[X]	que su consumo durante el ensayo sea despreciable frente a su concentración
[S1]	saturante
[S2]	saturante
[E2]	relativamente alta, no limitante
[E3]	relativamente alta, no limitante

el sistema de ecuaciones diferenciales que describe el mecanismo de la figura 1 es:

$$\frac{d[Y]}{dt} = v_1 - k_2 \cdot [Y] + k_3 \cdot [Z] \quad (4)$$

$$\frac{d[Y]}{dt} = k_2 \cdot [Y] - k_3 \cdot [Z] \quad (5)$$

$$\frac{d[P1]}{dt} = k_2 \cdot [Y] \quad (6)$$

$$\frac{d[P2]}{dt} = k_3 \cdot [Z] \quad (7)$$

donde k_2 y k_3 son las constantes de velocidad aparentes de primer orden, $k_2 = V_{m2}/K_{m2}$ (V_{m2} es la velocidad de reacción del paso (2) a concentración saturante de Y y S1; K_{m2} es una función de las constantes de Michaelis-Menten de Y y S1 para E2 y de la concentración inicial de S1, donde $K_{m2} \approx K_{mY}$ si S1 es saturante), $k_3 = V_{m3}/K_{m3}$ (V_{m3} es la velocidad de reacción del paso (3) a concentración saturante de Z y S2; K_{m3} es una función de las constantes de Michaelis-menten de Z y S2 para E3 y de la concentración inicial de S2 donde $K_{m3} \approx K_{mZ}$ si S2 es saturante).

ES 2 110 910 A1

Las condiciones iniciales de este sistema de ecuaciones diferenciales son que a tiempo cero, $t=0$ $[Y]=Y_0$ (caso general en que X no es un compuesto puro y puede estar contaminado por una cantidad Y_0 de Y) y $[Z]=[P1]=[P2]=0$.

5 Las ecuaciones diferenciales (4) y (5) constituyen un sistema lineal no homogéneo que puede hacerse homogéneo por derivación y cambio de variable: $d[Y]/dt=F$, $d[Z]/dt=G$, dando

$$\frac{dF}{dt} = -k_2 \cdot F + k_3 \cdot G \quad (8)$$

10

$$\frac{dG}{dt} = k_2 \cdot F - k_3 \cdot G \quad (9)$$

15 cuyas condiciones iniciales son a $t=0$, $F_0=V_1-k_2 \cdot Y_0$ y $G_0=k_2 \cdot Y_0$. La solución de este sistema viene dada por

$$F = \frac{k_2 \cdot (V_1 - \mu \cdot Y_0)}{\mu} \cdot e^{-\mu \cdot t} + \frac{k_3 \cdot V_1}{\mu} \quad (10)$$

20

$$G = \frac{k_2 \cdot (V_1 - \mu \cdot Y_0)}{\mu} \cdot e^{-\mu \cdot t} + \frac{k_2 \cdot V_1}{\mu} \quad (11)$$

25 donde $\mu=k_2+k_3$. Integrando las ecuaciones (10) y (11) para volver a la simbología original tenemos:

$$[Y] = \frac{k_2 \cdot (V_1 - \mu \cdot Y_0)}{\mu^2} \cdot (1 - e^{-\mu \cdot t}) + \left(\frac{k_3 \cdot V_1}{\mu} \right) \cdot t + Y_0 \quad (12)$$

30

$$[Z] = -\frac{k_2 \cdot (V_1 - \mu \cdot Y_0)}{\mu^2} \cdot (1 - e^{-\mu \cdot t}) + \left(\frac{k_2 \cdot V_1}{\mu} \right) \cdot t \quad (13)$$

35 Sustituyendo las ecuaciones (12) y (13) en las ecuaciones (6) y (7) respectivamente, e integrando, obtenemos bajo la condición de estado estacionario ($t \rightarrow \infty$) que permite hacer despreciables los términos exponenciales:

$$[P1] = \left(\frac{k_2 \cdot k_3 \cdot V_1}{2\mu} \right) \cdot t^2 + \left(\frac{k_2^2 \cdot (V_1 - \mu \cdot Y_0)}{\mu^2} + k_2 \cdot Y_0 \right) \cdot t - \frac{k_2^2 \cdot (V_1 - \mu \cdot Y_0)}{\mu^3} \quad (14)$$

40

$$[P2] = \left(\frac{k_2 \cdot k_3 \cdot V_1}{2\mu} \right) \cdot t^2 - \left(\frac{k_2 \cdot k_3 \cdot (V_1 - \mu \cdot Y_0)}{\mu^2} \right) \cdot t + \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot (V_1 - \mu \cdot Y_0)}{\mu^3} \quad (15)$$

45 Las ecuaciones (14) y (15) indican que los productos netos del ciclo, P1 y P2, se acumulan según una parábola cuando se alcanza el estado estacionario, es decir, que la velocidad de reacción observada incrementa continuamente siempre que las condiciones impuestas (Tabla 1) se mantengan.

50 Las ecuaciones (14) y (15) indican también que en ausencia de enzima problema ($V_1=0$) los productos se acumulan por la presencia del contaminante Y_0 , según las ecuaciones lineales:

$$[P1_0] = \left(k_2 \cdot Y_0 - \frac{k_2^2 \cdot \mu \cdot Y_0}{\mu^2} \right) t + \frac{k_2^2 \cdot \mu \cdot Y_0}{\mu^3} \quad (16)$$

55

$$[P2_0] = \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot \mu \cdot Y_0}{\mu^2} \cdot t - \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot \mu \cdot Y_0}{\mu^3} \quad (17)$$

60 siendo la acumulación de productos debido a la acción de E1 la diferencia $P1-P1_0$ y $P2-P2_0$:

$$[P1] - [P1_0] = V_1 \cdot \left(\frac{k_2 \cdot k_3}{2\mu} \cdot t^2 + \frac{k_2^2}{\mu^2} \cdot t - \frac{k_2^2}{\mu^3} \right) \quad (18)$$

$$[P2] - [P2_0] = V_1 \cdot \left(\frac{k_2 \cdot k_3}{2\mu} \cdot t^2 - \frac{k_2 \cdot k_3}{\mu^2} \cdot t + \frac{k_2 \cdot k_3}{\mu^3} \right) \quad (19)$$

5

es decir que para un tiempo fijo "t", la diferencia de concentración y, por tanto de absorbancia, entre el blanco sin E1 y la muestra es proporcional a la concentración de E1, y dicha constante de proporcionalidad aumenta a medida que el tiempo escogido para la determinación es mayor.

10

Si μ se hace muy grande, la condición de estado estacionario se alcanza desde el inicio de la reacción, validando así las ecuaciones (14) a (19). Para asegurarse de que se ha alcanzado el estado estacionario se toma la primera derivada de la curva de acumulación de P1 o P2, comprobándose que sea lineal.

15

Como resultado del análisis matemático anterior, se llega a la conclusión de que alimentando uniformemente el SEC con Y, debido al consumo de X por E1 en estado estacionario, P1 y P2 se acumulan exponencialmente en el medio, con la consiguiente amplificación de la reacción catalizada por E1.

20

La cantidad de producto acumulado a un tiempo dado es proporcional a la concentración de E1 y la constante de proporcionalidad aumenta con el tiempo.

25

Los resultados obtenidos anteriormente son aplicables a cualquier sistema enzimático del tipo del representado en la figura 1, independientemente de si la reacción catalizada por E1, E2 o ambas utiliza uno o más sustratos aparte de B o C o con diferente estequiometría, y de si produce uno o más productos aparte de C o B o con diferente estequiometría.

30

Como resultado del tratamiento matemático expuesto anteriormente, surge el método objeto de la presente invención correspondiente al ensayo d e la actividad de fosfatasa alcalina con β -NADP⁺ como sustrato, mejorándose sensiblemente los métodos de detección actuales basados en la hidrólisis de p-nitrofenil fosfato [(11) Fernley, H.N. (1971) en "The enzymes" 3^a edición (Boyer, P.D., ed) 4, 417-447].

35

De acuerdo con la presente invención, utilizando fosfatasa alcalina ligada a un anticuerpo contra inmunoglobulina G humana, la sensibilidad se mejora en 11, 16 y 27 veces al cabo de 30, 40 y 60 minutos de reacción respectivamente, si se compara con la detección directa de la enzima con p-nitrofenil fosfato.

40

Por lo tanto, la presente invención se basa en un método de determinación de los niveles de fosfatasa alcalina basado en el acoplamiento a un sistema enzimático cíclico (SEC).

45

El método se basa en el esquema de la figura 2 donde Fosfatasa Alcalina (FA), Alcohol deshidrogenasa (ADH) y Diaforasa son respectivamente E1, E2 y E3. Por su parte, β -NADP⁺, β -NAD⁺ y β -NADH son X, Y y Z, respectivamente, y los sustratos etanol, S1, e INT (p-yodonitrotetrazolio violeta), S2, son transformados respectivamente en los productos acetaldehído, P1, y formazán, P2.

50

En cada ciclo completo del método de la presente invención, a partir de una molécula de INT, se genera una molécula de formazán, intensamente coloreado, detectable en la región visible por su banda de absorción con λ max a 492 nm ($\epsilon_{492} = 19.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), siendo el incremento de productos acumulados a un tiempo dado directamente proporcional a la velocidad de reacción del paso (1), es decir, la actividad de la fosfatasa alcalina.

55

El método de la invención tiene especial aplicación en las determinaciones analíticas mediante técnicas de inmunoensayo enzimático.

60

Las técnicas ELISA son inmunoensayos enzimáticos capaces de detectar cualquier molécula que pueda ligarse específicamente a un anticuerpo. En última instancia la interacción entre la molécula problema y su anticuerpo específico se pone de manifiesto mediante una reacción enzimática que genera productos coloreados. Fosfatasa alcalina es una enzima ampliamente utilizada en técnicas ELISA, conjugada normalmente con un anticuerpo monoclonal o un antisuero. La sensibilidad de la técnica ELISA depende del número de moléculas de sustrato transformadas por la FA conjugada en un tiempo dado.

65

Como se muestra en la técnica SEC, los niveles de FA pueden amplificarse, con el consiguiente aumento de la sensibilidad en la detección de sus niveles, y por lo tanto de una técnica ELISA basada en FA.

Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Sistema enzimático cíclico acoplado. Secuencia de reacciones.

Figura 2.- Esquema de las reacciones que tienen lugar en el acoplamiento de la desfosforilación de β -NADP⁺ por fosfatasa alcalina al SEC constituido por alcohol deshidrogenasa y diaforasa.

Figura 3.- Relación entre la absorbancia neta y la concentración de fosfatasa alcalina a diversos tiempos de la reacción usando el sistema ADH-diaforasa. Curva número 1 a los 5', 2 a los 10', 3 a los 20', 4 a los 30', 5 a los 40' y 6 a los 60'.

10 Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

15 Ejemplo 1

Método de acoplamiento de la desfosforilación de β -NADP⁺ por fosfatasa alcalina al SEC alcohol deshidrogenasa/diaforasa.

20 Materiales y reactivos.

Fosfatasa alcalina tipo V de intestino de pollo, albúmina de suero bovino (fracción V), glicina, dietanolamina, β -NADP⁺, violeta de p-iodonitrotetrazolio (INT), fosfatasa alcalina conjugada con anticuerpos anti inmunoglobulina G (específico de Fab) humana y diTris p-nitrofenil fosfato se compró a Sigma Química, Madrid. Alcohol deshidrogenasa de levaduras y diaforasa de microorganismos se obtuvo de Boehringer-Mannheim, Barcelona. Etanol 99% se compró de Panreac, Montcada y Reixac, Barcelona. Los demás reactivos empleados fueron de grado analítico. Todas las disoluciones fueron preparadas con agua bidestilada y purificada en equipo Milli Q, Millipore, Barcelona.

Todas las reacciones se realizaron en cubetas de plástico de 1 cm de paso óptico y, las lecturas espectrofotométricas en un espectrofotómetro Uvikon 940 de Kontron Instruments, Milán, Italia, equipado con accesorio de termostatación.

35 Determinación de niveles de fosfatasa alcalina (FA)**1.- Método estándar [11]**

Este método se usará como referencia para comparar con el método acoplado a un SEC. El método se basa en la desfosforilación de p-nitrofenil fosfato (p-NFF) y aparición de p-nitrofenol, detectable en la región visible por su banda de absorción con λ max a 405nm ($\epsilon_{405} = 1850 \text{ N}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para iniciar la reacción, se añaden 0,025 ml de la muestra problema a 1 ml de un medio de reacción que contiene: tampón 10% dietanolamina pH 9,8, 1% de p-NFF y 0,5mM de MgCl₂. Una unidad de fosfatasa alcalina se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de p-NFF en un minuto bajo las condiciones especificadas a 25°C.

Método acoplado a un SEC.

El método se basa en el esquema de la figura 2, donde FA (EC 3.1.3.1) de intestino de pollo, alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) de levadura (ADH) y diaforasa (NADH-pigmento oxidoreductasa EC 1.8.1.4) de microorganismos son respectivamente E1, E2 y E3. β -NADP⁺, β -NAD⁺ y β -NADH son X, Y y Z respectivamente, y los sustratos etanol, S1, e INT (p-iodonitrotetrazolio violeta), S2, son transformados respectivamente en los productos acetaldehído, P1, y formazán, P2. En cada ciclo completo, a partir de una molécula de INT, se genera una molécula de formazán, intensamente coloreado, detectable en la región visible por su banda de absorción con λ max a 492nm ($\epsilon_{492} = 19.400\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Como indican las ecuaciones (18) y (19) el incremento de productos acumulados a un tiempo dado es directamente proporcional a la velocidad de reacción del paso (1), es decir de la actividad FA.

2.1. Evaluación de condiciones óptimas del SEC ADH-Diaforasa.

Las condiciones óptimas se pueden evaluar usando el SEC sin acoplar. Las ecuaciones (16) y (17) describen la acumulación de productos a lo largo del tiempo en un SEC no acoplado bajo las mismas

ES 2 110 910 A1

restricciones que en el presente caso. Cuando se alcanza el estado estacionario (que puede ser durante el tiempo de mezclado de los reactivos si μ es grande), el producto se acumula linealmente con el tiempo.

Así, utilizando una concentración fija de β -NAD⁺ de 0,44 μ M se determinaron las condiciones saturantes de INT y etanol y las concentraciones de ADH y diaforasa que permitían una acumulación lineal de producto desde el propio origen de la reacción.

Estas condiciones, que se muestran en la siguiente Tabla 2, aseguran un estado estacionario desde el principio de la reacción cuando el SEC se acopla a FA,

TABLA 2

Condiciones óptimas del SEC ADH/diaforasa acoplado a FA

Variable	Valor optimizado
[β -NADP ⁺]	0.25mM
[etanol]	0.33M
[INT]	0.5mM
[ADH]	20 μ g/ml (6 U/ml)
[diaforasa]	66 μ g/ml (1 U/ml)
pH	8.8

Además, se añaden al medio de reacción iones Mg⁺⁺ 8,33 mM, Tween 80 0,1% p/v y albúmina de suero bovino (ASB) 5 mg/ml, como cofactores o estabilizantes de sustratos y enzimas. El medio se tampona con Tris/HCl 0,1M a pH 8,8.

2.2. *Determinación de FA mediante acoplamiento al SEC ADH/diaforasa y comprobación por otros métodos.*

Para comprobar la bondad del método y establecer una equivalencia con el estándar, se prepara una muestra de FA comercial de 2 μ g/ml en tampón Tris/HCl 0,1M de pH 8,8 conteniendo 1 mg/ml de ASB. La muestra así preparada se ensaya para actividad FA mediante el método estándar y mediante el acoplamiento a ADH/diaforasa. Como resultado se obtiene que una unidad determinada con el método estándar equivale a la desfosforilación de 0,384 μ moles de β -NADP⁺/min.

Para estimar la sensibilidad del método acoplado a ADH/diaforasa con respecto al estándar, una cantidad conocida de FA se somete a diluciones sucesivas en tampón Tris/HCl 0,1M de pH 8,8 conteniendo 1 mg/ml de ASB. Cada muestra así preparada se ensayó para actividad FA por los dos métodos. Después de 30, 40 y 60 minutos se determina la absorbancia neta de las muestras (muestra-blanco). Los resultados se dan en Tabla 3.

ES 2 110 910 A1

TABLA 3

Comparación del método SEC con el método estándar.

Se dan las absorbancias netas en cada caso. Los valores inferiores a 1 son obtenidos directamente del espectrofotómetro. Los valores superiores son obtenidos por extrapolación una vez ajustados los registros experimentales a las ecuaciones correspondientes: una ecuación del tipo $y=a.x$ en el caso del método estándar y la ecuación (19) en el caso del método ADH-Diaforasa.

n.m. indica “no medido”, y n.d. indica “no detectable”.

10

15

20

25

30

35

40

45

[FA] o dilución anticuerpo	Método Estándar			Método ADH-Diaforasa		
	30 min	40 min	60 min	30 min	40 min	60 min
1 $\mu\text{g/ml}$	7.89	10.52	15.78	n.m.	n.m.	n.m.
50 ng/ml	0,444	0.592	0.888	26.3	46.7	104.9
30 ng/ml	0.267	0.356	0.534	n.m.	n.m.	n.m.
12.5 ng/ml	0.123	0.164	0.246	n.m.	n.m.	n.m.
2.5 ng/ml	0.021	0.028	0.042	1.59	2.75	6.02
250 $\mu\text{g/ml}$	n.d.	n.d.	n.d.	0.172	0.274	0.54
100 $\mu\text{g/ml}$	n.d.	n.d.	n.d.	0.059	0.079	0.122
1/2500	12.45	16.6	24.9	254	452	1019
1/50000	0.681	0.908	1.362	14.5	25.9	58.8
1/250000	0.15	0.2	0.3	2.11	3.86	8.9
1/1000000	0.036	0.048	0.071	0.412	0.816	2.025
1/15000000	n.d.	n.d.	n.d.	0.083	0.164	0.41
1/10000000	n.d.	n.d.	n.d.	0.038	0.076	0.18

Como comprobación de las predicciones de las ecuaciones (18) y (19), es decir, que la absorbancia neta a un tiempo fijo depende linealmente de la actividad fosfatasa alcalina y que la constante de proporcionalidad aumenta con el tiempo de reacción, se han representado las absorbancias netas a diversos tiempos de reacción frente a la concentración de fosfatasa alcalina, mostrándose el resultado en la figura 3. Concentraciones de 2,5 ng/ml pueden ser apenas detectadas mediante el método estándar, sin embargo, niveles 25 veces inferiores se pueden llegar a detectar perfectamente con el método ADH-diaforasa.

Para calcular el grado de mejora se determinaron las cantidades mínimas detectables (c.m.d.) en cada ensayo. Para ello se establece que la c.m.d. debe producir una absorbancia neta de 0,25 unidades en el tiempo establecido. En la Tabla 4 se muestran dichos valores con los cálculos de la mejora obtenida a los 30, 40 y 60 minutos de reacción. Se llegan a obtener mejoras de más de 100 veces en una hora de ensayo.

60

TABLA 4

Mejora del método ADH-Diaforasa respecto del estandar en la determinación de fosfatasa alcalina libre y ligada a un anticuerpo.

5 La cantidad mínima detectable (c.m.d.) o dilución máxima detectable (d.m.d.) de fosfatasa alcalina en el tiempo indicado es aquella que produce una absorbancia neta de 0,25 unidades.

Forma de FA	Tiempo (minutos)	c.m.d. o d.m.d. método estandar	c.m.d. o d.m.d. método ADH-diaforasa	Mejora
Libre	30	28 ng/ml	0.36 ng/ml	77
	40	20 ng/ml	0.23 ng/ml	87
	60	13 ng/ml	0.11 ng/ml	118
Ligada a anticuerpo	30	1/150000	1/1660000	11
	40	1/200000	1/3280000	16.4
	60	1/300000	1/8200000	27.3

Ejemplo 2

30 *Utilización del método de acoplamiento de FA al SEC ADH/diaforasa en determinaciones analíticas mediante técnicas ELISA.*

35 Para demostrar la mejora del método acoplado a un SEC, con respecto al estandar, también en técnica ELISA, se procede igual que en el Ejemplo anterior, mediante diluciones sucesivas, pero usando como fuente de enzima una preparación comercial de FA conjugada con un anticuerpo contra inmunoglobulina G humana.

40 La absorbancia neta después de 30, 40 y 60 minutos (muestra-blanco) es determinada y los resultados se dan en la Tabla 3. En este caso, diluciones por debajo de 1.000.000 apenas son detectables, mientras que se puede superar las diluciones de 10.000.000 con el método ADH-Diaforasa.

45 En la Tabla 4 se muestran los resultados de la mejora obtenida tras determinar las diluciones máximas detectables (d.m.d.). Con ensayos de 1 hora se pueden obtener mejoras próximas a las 30 veces. El menor grado de mejora obtenido con la FA conjugada se debe a que la enzima de ternera utilizada para conjugar a anticuerpos normalmente, es más activa contra p-nitrofenil fosfato que la de pollo [11].

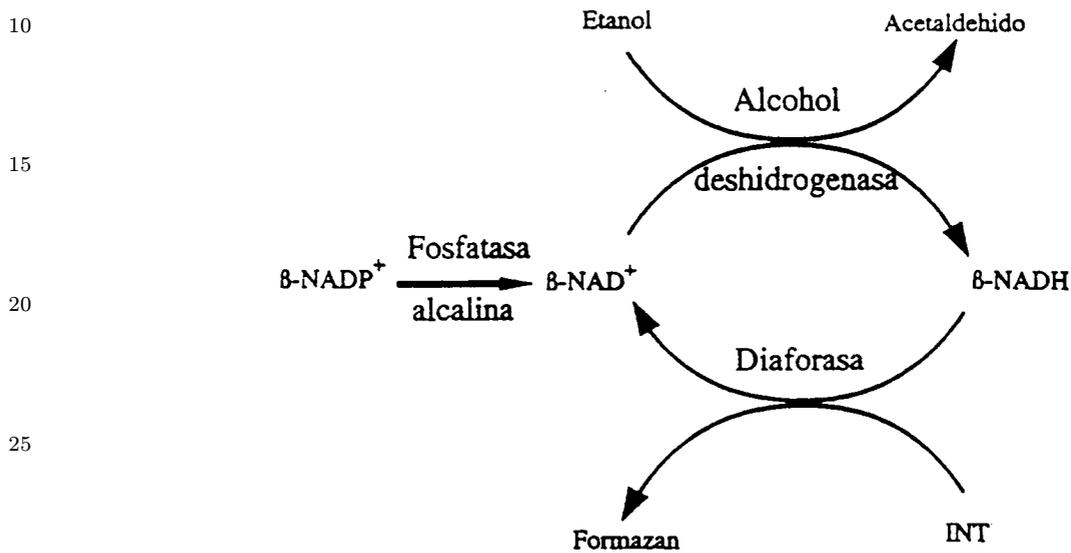
50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Método para la amplificación de reacciones enzimáticas basado en el acoplamiento a sistemas enzimáticos cíclicos y en especial método para la determinación de fosfatasa alcalina en una muestra, **caracterizado** porque comprende el acoplamiento de la reacción de desfosforilación del β -NADP⁺ por acción de la fosfatasa alcalina con el SEC alcohol deshidrogenasa/diaforasa representado por el esquema de reacción siguiente:



de tal modo que en cada ciclo completo, a partir de una molécula INT, se genera una molécula de formazán detectable en la región visible por su banda de absorción con λ max a 492nm ($\epsilon_{492} = 19.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2. Aplicación del método de la reivindicación 1, a las determinaciones analíticas, biológicas o clínicas, basadas en fosfatasa alcalina.

3. Aplicación según la reivindicación 2, donde las determinaciones analíticas basadas en fosfatasa alcalina son técnicas ELISA y otros inmunoensayos enzimáticos.

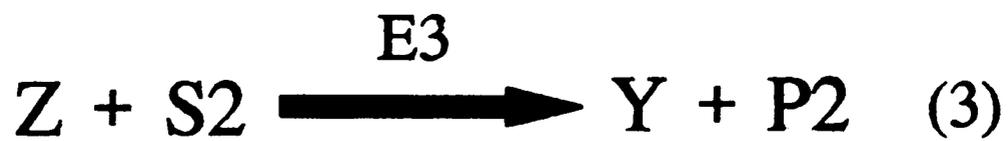
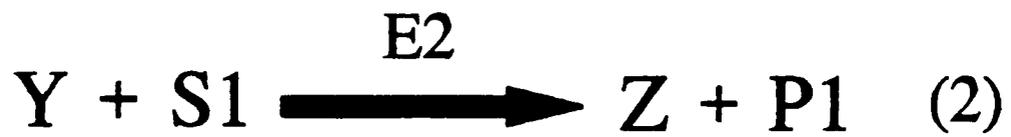


FIGURA 1

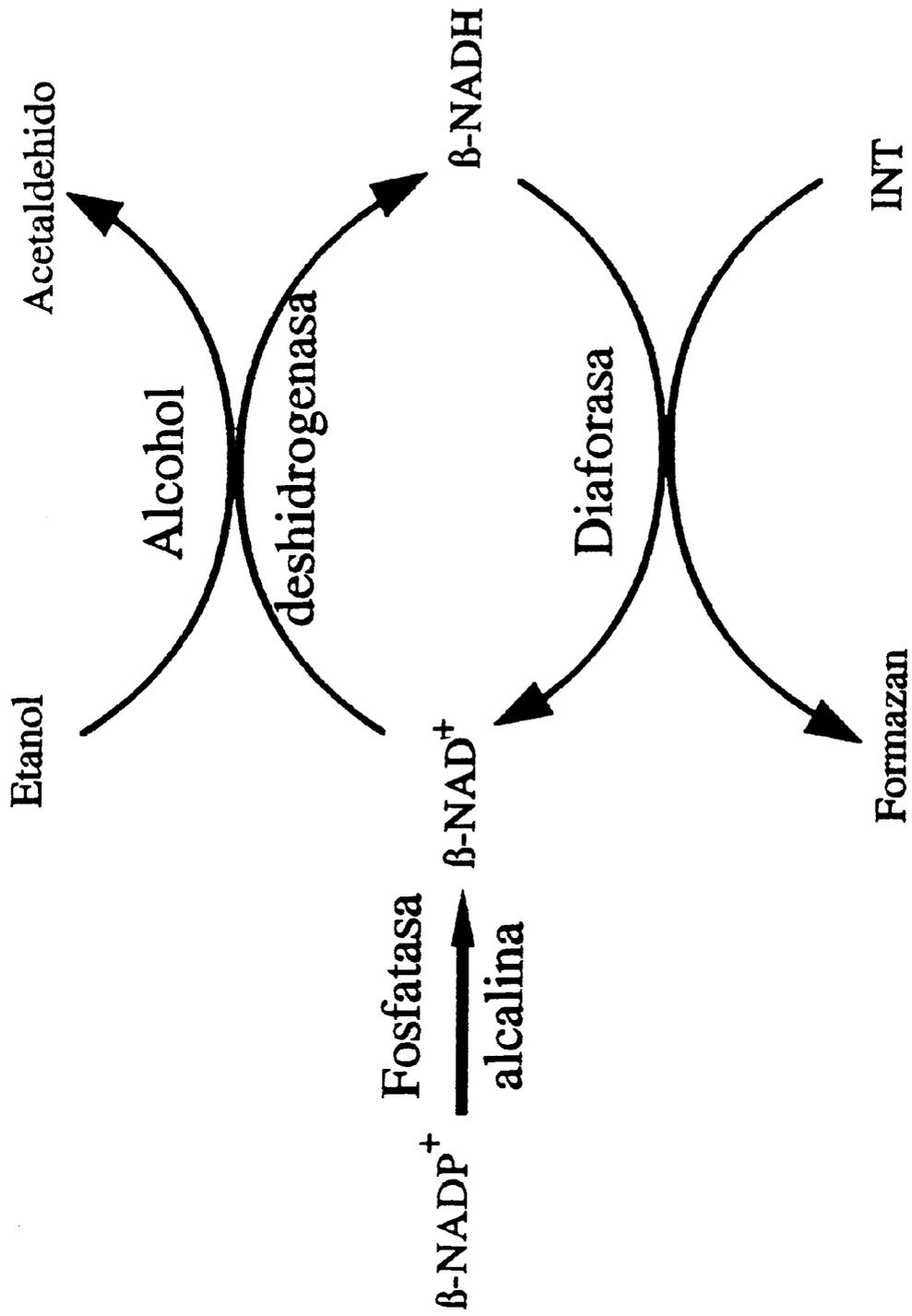


FIGURA 2

Absorbancia neta frente a [FA] a tiempos seleccionados

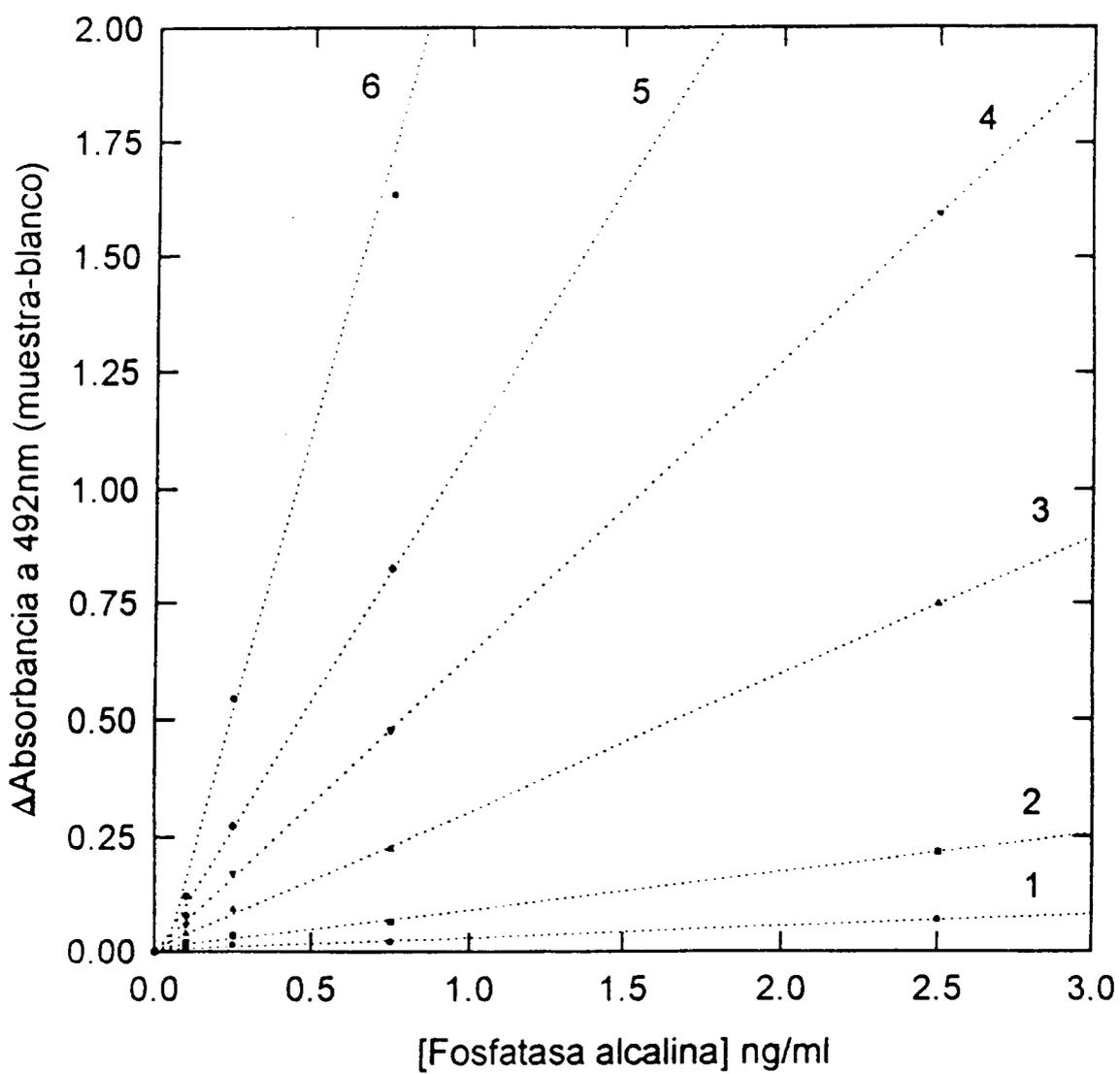


FIGURA 3



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12Q1/42, 1/32, 1/26

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP-0598620-A (UNITIKA LTD.) 25.05.94 * pág. 2, líneas 21-52 y pág. 3, líneas 1-21 *	1-3
X	Cardosi, M.F. et al., "An electrochemical immunoassay for prostatic acid phosphatase incorporating enzyme amplification", 1989, Am. Biotechnol. Lab., 7 (5), pp.: 50-58 * todo el documento; en especial pág. 50, 2ª columna, 3er párrafo y figura 1 *	1-3

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 n.º:

Fecha de realización del informe

14.01.98

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1