

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 273**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/30** (2006.01)

**C12Q 1/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2008 E 08830181 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2199404**

54 Título: **Procedimiento de reducción del error de medición provocado por la inhibición de la catalasa por una azida**

30 Prioridad:

**12.09.2007 JP 2007236242**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**06.03.2014**

73 Titular/es:

**DENKA SEIKEN CO., LTD. (100.0%)  
4-2, NIHONBASHI KAYABACHO 3-CHOME  
CHUO-KU, TOKYO 103-0025, JP**

72 Inventor/es:

**HIRAO, YUHKO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 446 273 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

Procedimiento de reducción del error de medición provocado por la inhibición de la catalasa por una azida

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para reducir los errores de medición debido a la inhibición de la catalasa por una azida.

### 10 **Antecedentes de la técnica**

En el campo de los ensayos clínicos se ha usado ampliamente un procedimiento para la medición de la concentración de un compuesto a medir en una muestra de ensayo, procedimiento que permite la generación de peróxido de hidrógeno a partir del compuesto a ser medido, peróxido de hidrógeno que se cuantifica a continuación. En un procedimiento tal, el peróxido de hidrógeno generado a partir de sustancias distintas a las del componente a medir se convierte en una fuente de error. Por lo tanto, para eliminar el peróxido de hidrógeno se utilizan generalmente un procedimiento en el que el peróxido de hidrógeno generado a partir de sustancias distintas al componente a medir se descompone en agua y oxígeno por la acción de la catalasa y un procedimiento que utiliza peroxidasa en el que un compuesto donante de hidrógeno de tipo fenol o de tipo anilina se deja reaccionar con peróxido de hidrógeno para convertir el peróxido de hidrógeno en una quinona incolora. Por ejemplo, se utilizan en un reactivo para la medición de grasa neutra, como un sistema para la eliminación de glicerol libre endógeno; en un reactivo para la medición de creatinina, como un sistema para la eliminación de creatina y sarcosina, y en un reactivo para la medición del colesterol HDL o del colesterol LDL, como un sistema para la eliminación del colesterol en lipoproteínas distintas a las del componente a medir. Convencionalmente, en un sistema de medición que utiliza una catalasa, se usa generalmente una catalasa derivada de bovino.

Entre estos, se utiliza con frecuencia un sistema de eliminación que usa catalasa, pero a veces se ve alterado por la contaminación de un compuesto que inhibe la catalasa. Especialmente, la contaminación con azida inhibe fuertemente a la catalasa incluso en los casos en que su cantidad es muy pequeña y altera el sistema de eliminación, de modo que el peróxido de hidrógeno derivado de un componente diferente al componente a medir no puede ser suficientemente eliminado, lo que conduce a errores en los valores de medición.

Dado que las azidas, tales como la azida sódica son ampliamente utilizadas en el campo de los ensayos clínicos como antisépticos, es muy probable que los sistemas de medición estén contaminados. Ejemplos de casos conocidos de contaminación con azida en un sistema de medición incluyen los casos en los que la azida está contenida en la propia muestra a medir, los casos en los que la azida se disuelve en un reactivo de medición por vaporización de la azida como azida de hidrógeno a partir de un reactivo que contiene azida existente en la proximidad de la misma, y los casos en los que azida contamina un reactivo de medición procedente de otro reactivo que contiene azida a través de una sonda colectora del reactivo de un analizador automático.

[Literatura de Patente 1] JP 10-14596 A  
[Literatura de Patente 2] JP 3164829 B  
[Literatura Patente 3] JP 3058602 B

### 45 **Descripción de la invención**

#### **Problemas a resolver por la invención**

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para reducir los errores de medición debido a la inhibición de la catalasa por una azida, en un procedimiento para la cuantificación de un componente a medir que comprende la etapa de descomponer el peróxido de hidrógeno derivado de un componente distinto del componente a medir.

#### **Medios para resolver los problemas**

Los presentes inventores investigaron intensamente hasta descubrir que las catalasas que tienen una subunidad que tiene una masa molecular de 75 kDa o mayor y se derivan de microorganismos son menos sensibles a la inhibición por una azida que las catalasas derivadas de bovino que se han utilizado convencionalmente, e infirieron que, utilizando como catalasa una catalasa usada para un sistema de medición que tiene una subunidad que tiene una masa molecular de 75 kDa o mayor y deriva de un microorganismo, los errores de medición debido a la inhibición de la catalasa por una azida se pueden reducir, completando así la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir los errores de medición cuando el peróxido de hidrógeno derivado de un componente diferente al componente a medir se descompone por una catalasa seguido por la cuantificación de peróxido de hidrógeno derivado del componente a medir para cuantificar dicho componente a medir, siendo dichos errores de medición debidos a la inhibición de la catalasa por una azida,

comprendiendo dicho procedimiento la utilización como dicho catalasa, una catalasa que tiene una subunidad que tiene una masa molecular de 75 kDa o mayor y deriva de un microorganismo.

### Efectos de la invención

Por la presente invención, se proporciona en primer lugar un procedimiento para reducir los errores de medición debido a la inhibición de catalasa por azida. Por la presente invención, los componentes a medir, tales como grasa neutra, colesterol LDL, colesterol HDL y creatinina se pueden cuantificar con mayor precisión que con los procedimientos convencionales.

### Mejor modo de llevar a cabo la invención

Como se describió anteriormente, los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que las catalasas que tienen una subunidad que tiene una masa molecular de 75 kDa o mayor y se derivan de microorganismos son menos sensibles a la inhibición por azida que las catalasas derivadas de bovino que se han utilizado convencionalmente. La presente invención se basa en este descubrimiento.

Las catalasas monofuncionales que son catalasas que contienen hemo se pueden agrupar en catalasas que tienen una subunidad pequeña (55 a 69 kDa) y catalasas que tienen una subunidad grande (no inferior a 75 kDa). Las catalasas utilizadas en la presente invención son las catalasas descritas anteriormente que tienen una subunidad grande (no menos de 75 kDa).

Ejemplos de microorganismos de los que derivan las catalasas descritas anteriormente usadas en la presente invención incluyen las de hongos, bacterias y una parte de las arqueobacterias, más particularmente, *Podospira anserina*, *Neurospora crossa*, *Cladosporium fulvum*, *Emericella nidulans*, *Pleurotus ostreatus*, *Deinococcus radiodurans*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Mycobacterium avium*, *Botryotinia fuckeliana*, *Claviceps purpurea*, *Aspergillus fumigatus*, *Ajellomyces capsulatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Nosema locustae*, *Xanthomonas oryzae* y *Xanthomonas campestris*. Aunque las bacterias y similares son conocidos por producir una pluralidad de tipos de catalasas, las que tienen una subunidad grande (no menos de 75 kDa) son las catalasas utilizadas en el procedimiento de la presente invención. Incluso en aquellos casos donde las catalasas descritas anteriormente tienen una subunidad pequeña y están contenidas en las catalasas descritas anteriormente que tienen una subunidad grande, la presente invención puede llevarse a cabo sin ningún problema.

Ejemplos de catalasas que se sabe que son producidas por los microorganismos descritos anteriormente y que tienen una subunidad grande (no menos de 75 kDa) incluyen CatA de *Podospira anserina*, Cat A de *Aspergillus fumigatus*, CatA de *Emericella nidulans*, CatA de *Ajellomyces capsulatus*, KatE de *Escherichia coli*, K12 de *Escherichia coli*, CatC de *Pseudomonas putida*, catalasa 2 de *Bacillus subtilis*, KatE de *Bacillus subtilis*, KatA de *Bacillus firmus*, KatE de *Mycobacterium avium*, CatB de *Aspergillus fumigatus*, CatB de *Ajellomyces capsulatus*, CatA de *Aspergillus nidulans*, CatR de *Aspergillus niger*, CatC de *Agrobacterium tumefaciens*, CatC de *Sinorhizobium meliloti*, *Nosema locustae*, KatX de *Xanthomonas oryzae* y KatE de *Xanthomonas campestris*. Se describe en "Bacterial Catalase in the Microsporidian *Nosema locustae*: Implications for Microsporidian Metabolism and Genome Evolution" Naomi M. Fast et al., EUKARYOTIC CELL, Oct. 2003, p. 1069-1075 que estas catalasas están genéticamente relacionadas entre sí, y estas catalasas se sabe que tienen hemo d. Es bien sabido que las enzimas relacionadas genéticamente tienen características similares. Por lo tanto, las catalasas utilizadas en la presente invención no se limitan a las enumeradas anteriormente y se puede utilizar cualquier catalasa en el procedimiento de la presente invención siempre que se trate de una catalasa relacionada genéticamente que tenga hemo D y una subunidad que tenga una masa molecular de 75 kDa o mayor. Aunque el límite superior de la masa molecular de la subunidad grande descrito es de 84 kDa o 90 kDa, en la presente invención se puede utilizar cualquier catalasa relacionada genéticamente. "Genéticamente relacionada" significa que en un análisis filogenético se consideran relacionadas y agrupadas en el mismo grupo mediante un procedimiento convencional basado en las secuencias de aminoácidos, por lo que, por ejemplo, las catalasas agrupadas en el Grupo II por el procedimiento descrito en las referencia bibliográfica anterior por Fast et al. puede decirse que están genéticamente relacionadas entre sí. Como la catalasa, se puede utilizar ya sea un solo tipo o una mezcla de una pluralidad de tipos de catalasa(s). En los casos en que se usan 2 o más tipos de catalasas, estas pueden ser tanto catalasas derivadas del mismo tipo de microorganismo como catalasas derivadas de diferentes tipos de microorganismos.

Están comercializadas diversos tipos de tales catalasas y los productos comercialmente disponibles se pueden emplear preferentemente. También se pueden obtener por un procedimiento convencional, que es bien conocido en la técnica, procedimiento que comprende las etapas de cultivo de un microorganismo y la purificación de una catalasa a partir del cultivo.

Entre las azidas que pueden contaminar un sistema de medición e inhiben la catalasa, aquellas problemáticas para la medición cuantitativa de diversos componentes son principalmente azidas metálicas tales como azida sódica utilizadas principalmente como antiséptico y azida de hidrógeno derivadas de las mismas y similares, pero no limitadas a estas.

El procedimiento de la presente invención es aplicable a cualquier procedimiento de cuantificación, procedimiento que comprende la descomposición del peróxido de hidrógeno derivado de un componente distinto al componente a medir por la catalasa, seguido por la cuantificación de peróxido de hidrógeno derivado del componente a medir para cuantificar el componente a medir. Como tal procedimiento de cuantificación en sí, en la técnica existen varios procedimientos bien conocidos. Ejemplos de los componentes a medir incluyen, pero no se limitan a, grasa neutra (triglicérido), HDL (lipoproteína de alta densidad), LDL (lipoproteína de baja densidad) colesterol y creatinina. El procedimiento de la presente invención puede llevarse a cabo mediante la realización de un procedimiento convencional, tal cual, para la cuantificación de cada componente a medir, salvo que se usa una catalasa que tiene una subunidad que tiene una masa molecular de 75 kDa o mayor y que deriva de un microorganismo.

El procedimiento de la presente invención comprende la descomposición, por una catalasa derivada de un microorganismo, de peróxido de hidrógeno derivado de un componente diferente al componente a medir, seguido por adición de azida. La catalasa utilizada en el procedimiento de la presente invención es menos sensible a la inhibición por azida, pero la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno de la catalasa puede ser detenida permitiendo que una cantidad suficiente de azida actúe sobre la misma. Mediante este procedimiento, es posible evitar la descomposición, por la catalasa, del peróxido de hidrógeno producido por la reacción de cuantificación.

El propio procedimiento de medición anteriormente ilustrado que utiliza una catalasa, para la medición de varios componentes a medir es bien conocido y por lo tanto no es necesario explicarlo en la presente memoria descriptiva, aunque el procedimiento se describirá brevemente a continuación.

La grasa neutra (triglicérido) se puede cuantificar mediante, por ejemplo, un procedimiento en el que la glicerol quinasa, la glicerol-3-fosfato-oxidasa y la catalasa se dejan actuar sobre la glicerina contenida en el fluido corporal, eliminando de este modo el peróxido de hidrógeno producido a partir de la glicerina, y la lipoproteína lipasa, la glicerol quinasa y la glicerol-3-fosfato-oxidasa, la peroxidasa y un cromógeno se dejan actuar sobre los triglicéridos del fluido corporal para permitir la producción de glicerina a partir de triglicérido, produciéndose glicerina que a continuación se deja que produzca glicerol-3-fosfato, glicerol-3-fosfato que se deja que produzca peróxido de hidrógeno, peróxido de hidrógeno, que a continuación se tiñe, seguido de la medición de su intensidad de color (Literatura de Patente 1).

El colesterol HDL se puede cuantificar mediante, por ejemplo, un procedimiento en el que la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa se dejan actuar en una muestra de ensayo en una solución tampón que mantiene un pH de 5 a 8 y en la presencia de un ion divalente y el peróxido de hidrógeno resultante se elimina por la catalasa, eliminando de este modo el colesterol de las lipoproteínas distintas a las lipoproteínas de alta densidad de la muestra de ensayo, seguido de la adición de un agente tensioactivo que actúa específicamente sobre las lipoproteínas de alta densidad y que tiene un HLB de 13 a 14 para el producto en la primera etapa y la cuantificación del peróxido de hidrógeno producido por las acciones de la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa para cuantificar el colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (Literatura de Patente 2).

El colesterol LDL se puede cuantificar mediante, por ejemplo, un procedimiento en el que la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa se dejan actuar en una muestra de ensayo en presencia de una solución tampón que contiene una amina y un tensioactivo que actúa sobre las lipoproteínas diferentes a las lipoproteínas de baja densidad, y el peróxido de hidrógeno resultante es eliminado por la catalasa, eliminando de ese modo el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad, las lipoproteínas de muy baja densidad y los quilomicrones de la muestra de ensayo, seguido por la cuantificación del colesterol restante en la muestra de ensayo (Literatura de Patente 3).

La creatinina se puede cuantificar mediante, por ejemplo, un procedimiento en el que la creatina amidinohidrolasa, la sarcosina oxidasa y la catalasa se dejan actuar sobre la creatina contenida en el fluido corporal y el peróxido de hidrógeno generado a partir de la creatina se elimina, dejando a continuación que la creatinina amidinohidrolasa, la creatina amidinohidrolasa, la sarcosina oxidasa y la peroxidasa y un cromógeno actúen en la creatinina del fluido corporal para permitir la generación de creatina a partir de la creatinina, dejando a continuación que la creatina genere sarcosina, la cual se deja a continuación generar peróxido de hidrógeno, el cual se tiñe a continuación y posteriormente se mide su intensidad del color (Literatura de Patente 1).

La presente invención se describirá ahora más concretamente por medio del Ejemplo siguiente. Sin embargo, la presente invención no se limita al ejemplo siguiente.

## Ejemplos

### Ejemplo comparativo 1, Ejemplo 1

Como reactivos para la eliminación de glicerol libre endógeno y medición de la grasa neutra, se prepara un primer reactivo y un segundo reactivo que tiene las composiciones siguientes (Ejemplo Comparativo 1).

Primer reactivo	Tampón PIPES, pH 6,5	50 mmol/l
	Glicerol quinasa	1000 U/l
	Glicerol-3-fosfato oxidasa	5000 U/l
	Catalasa (derivada de hígado bovino)	300.000 U/l
	N-(2-hidroxisulfopropil) -3,5-dimetoxianilina	0,3 mmol/l
	Adenosina 5'-trifosfato	1,6 mmol/l
	Cloruro de magnesio	7,5 mmol/l
	Polietilenglicol mono-p-isooctil fenil éter	0,3 %
Segundo reactivo	Tampón PIPES, pH 6,5	50 mmol/l
	Lipoproteína lipasa	3000 U/l
	Peroxidasa	3000 U/l
	4-aminoantipirina	4,2 mmol/l
	Azida sódica	0,1 %
	Cloruro de magnesio	7,5 mmol/l
	Polietilenglicol mono-p-isooctil fenil éter	0,3 %

5 Por otro lado, la catalasa en el primer reactivo del Ejemplo comparativo 1 descrito anteriormente se cambió por uno derivado de *Aspergillus niger* (CatR de *Aspergillus niger*, fabricado por Roche Diagnostics GmbH) para preparar un primer reactivo (Ejemplo 1).

10 Cuatro (4) µl de muestra (suero humano) a la que se añadió azida sódica a 0 a 0,1 % se mezclaron con 300 µl del primer reactivo precalentado a 37 °C y la mezcla resultante se dejó reaccionar a 37 °C durante 5 minutos, seguido de la adición de 100 µl del segundo reactivo a la misma, dejando que la mezcla resultante reaccionara durante 5 minutos y midiendo la absorbancia de la misma a 600 nm. A partir de la absorbancia medida, se calculó la cantidad de grasa neutra para obtener la cantidad de grasa neutra en la muestra. Los resultados del Ejemplo comparativo 1 y del Ejemplo 1 se muestran en la Tabla 1.

15

[Tabla 1]

Cantidad añadida de azida sódica (%)	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo 1
0,00	127,4	124,5
0,02	145,7	124,5
0,04	151,8	125,1
0,06	155,8	124,2
0,08	159,6	125,6
0,10	161,3	125,6

20

En el Ejemplo comparativo 1, la inhibición de la eliminación del glicerol libre endógeno aumentaba a medida que aumentaba la cantidad añadida de azida sódica en la muestra, lo que causó un aumento en el valor medido. Por otro lado, en el Ejemplo 1, un aumento en la cantidad añadida de azida sódica apenas causó un aumento en el valor medido, lo que sugiere que el sistema de eliminación no fue perturbado sustancialmente. Por esto, se puede ver que se puede llevar a cabo una medición exacta mediante la presente invención puesto que el sistema de eliminación por la catalasa no se altera sustancialmente incluso en presencia de contaminación de una azida.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para reducir errores de medición cuando el peróxido de hidrógeno derivado de un componente diferente a un componente a medir es descompuesto por una catalasa, seguido por la cuantificación del peróxido de hidrógeno derivado del componente a medir para cuantificar dicho componente a medir, siendo los errores de medición debidos a la inhibición de la catalasa por una azida, comprendiendo dicho procedimiento la utilización de dicha catalasa, una catalasa que tiene una subunidad que tiene una masa molecular de 75 kDa o mayor y deriva de un microorganismo.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha catalasa es una catalasa que tiene hemo d.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho microorganismo es un organismo de por lo menos una especie seleccionada de entre el grupo que consiste en microorganismos que pertenecen a los géneros *Podospora*, *Neurospora*, *Cladosporium*, *Emericelia*, *Pleurotus*, *Deinococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Botryotinia*, *Claviceps*, *Aspergillus*, *Ajellomyces*, *Agrobacterium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Nosema* y *Xanthomonas*.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho microorganismo pertenece a *Aspergillus*.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho componente a medir es grasa neutra, colesterol HDL, colesterol LDL o creatinina.