(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 615 307**

(51) Int. CI.:

G01N 33/531 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/72 (2006.01)
C07C 229/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2008 PCT/JP2008/068182**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09051032**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2008 E 08840474 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2204648**

(54) Título: **Método de estabilización de proteína hemo y disolución de almacenamiento para la misma**

(30) Prioridad:

16.10.2007 JP 2007268952

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2017

(73) Titular/es:

EIKEN CHEMICAL CO., LTD.
YAMAGUCHI BUILDING 7 19-9 TAITO 4-CHOME
TAITO-KU
TOKYO 110-8408, JP

(72) Inventor/es:

SUGO, SHIN

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Método de estabilización de proteína hemo y disolución de almacenamiento para la misma

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un método de estabilización de una proteína hemo, particularmente a un método de estabilización de una proteína hemo en una prueba de proteína hemo de heces, orina, o una muestra de sangre.

TÉCNICA ANTERIOR

En los últimos años, se han llevado a cabo ampliamente detecciones de hemoglobina humana fecal (sangre oculta fecal) producida por hemorragia de tubos gastrointestinales como método de cribado de un trastorno del aparato digestivo, tal como cáncer de colon. El método detectivo de hemoglobina humana es un método inmunológico que emplea un anticuerpo específico contra hemoglobina humana, que reemplaza un método de tira reactiva de la técnica relacionada basado en una reacción de coloración química. Este método no requiere una restricción dietética, y por lo tanto se ha establecido como un método de prueba conveniente.

Ejemplos de un método detectivo inmunológico para la hemoglobina humana incluyen: una prueba de inmunodifusión simple en placas de agar empleando una línea de precipitación entre un anticuerpo anti-hemoglobina humana y una hemoglobina humana en una muestra de prueba; una prueba de aglutinación en látex usando una partícula de látex sensibilizada con un anticuerpo anti-hemoglobina humana; inmunoensayo enzimático o radioinmunoensayo, usando un anticuerpo anti-hemoglobina humana marcado con una enzima o un elemento radiactivo; y método colorimétrico de agregación de coloide de oro usando una partícula de coloide de oro sensibilizada con un anticuerpo anti-hemoglobina humana.

Sin embargo, en una disolución de prueba, la hemoglobina humana se desnaturaliza gradualmente, y disminuye su antigenicidad. Por tanto, en una disolución de prueba, condiciones de almacenamiento tales como la temperatura de almacenamiento frecuentemente aceleran la desnaturalización de la hemoglobina humana, o bacterias y enzimas digestivas en las heces frecuentemente degradan la hemoglobina humana. Tal desnaturalización y degradación destruyen la conformación de la hemoglobina humana, produciendo una disminución de la antigenicidad. Por tanto, en un método inmunológico de medición de hemoglobina humana, la desnaturalización y degradación de la hemoglobina implican un diagnóstico incorrecto.

Mientras tanto, en una prueba de sangre oculta fecal, las heces son frecuentemente recogidas por los propios sujetos en sus casas, y se proveen para la prueba de un envase cerrado, disolviendo las heces en una disolución que disuelve las heces en el envase. En tales casos, la hemoglobina humana en las heces queda frecuentemente en la disolución durante varios días, o se pone a una alta temperatura si se utiliza un método de transporte tal como un servicio postal. Por tanto, incluso cuando las heces se recogen en un laboratorio clínico, algunas veces se necesita más tiempo hasta que se lleva a cabo la prueba de sangre oculta fecal debido a que también se realizan otras pruebas. Bajo tales circunstancias, una medición precisa se altera por la desnaturalización y degradación de la hemoglobina humana como se ha descrito anteriormente.

Para prevenir tal desnaturalización y degradación de la hemoglobina humana en una disolución, se han desarrollado un método de adición de agentes antibacterianos comunes tales como timerosal y clorhexidina (véase, por ejemplo, Documento de patente 1); un método de adición de sacáridos (véase, por ejemplo, Documento de patente 2); adición de hemoglobina de animales distintos de ser humano (véase, por ejemplo, Documento de patente 3); adición de sueros de animales distintos de ser humano (véase, por ejemplo, Documento de patente 4); adición de una enzima bacteriolítica (véase, por ejemplo, Documento de patente 5); adición de protoporfirina de hierro (véase, por ejemplo, Documento de patente 6), y similares.

Sin embargo, las técnicas para estabilizar la hemoglobina humana descritas en aquellas publicaciones no pueden suprimir completamente la desnaturalización y degradación de la hemoglobina humana en una disolución de prueba que contiene heces.

Distinto de aquellos descritos anteriormente, se ha desarrollado un método de estabilización de hemoglobina usando ácido etilendiaminatetraacético (abreviado en lo sucesivo EDTA) (véase, por ejemplo, Documento de patente 7).

Sin embargo, como resultado de estudios de repetición realizados por los inventores de la presente invención, se ha confirmado que no puede esperarse una acción de estabilización suficiente sobre la hemoglobina humana fecal con un simple uso de EDTA.

Entonces, el solicitante de la presente invención ha estado desarrollando un método de adición de un complejo de metal de transición acuoso que es más eficaz para la estabilización que EDTA solo (véase, por ejemplo, Documento de patente 8). Además, el solicitante ya ha desarrollado un método de estabilización de hemoglobina con el que coexiste un compuesto de ferrocianuro (véase, por ejemplo, Documento de patente 9); un método de estabilización de hemoglobina con el que coexiste un producto de degradación enzimática de hemoglobina (véase, por ejemplo, Documento de patente 10); un método de estabilización de un proteína hemo con el que coexisten metales de

transición (véase, por ejemplo, Documento de patente 11); un método de estabilización de una proteína hemo con el que coexiste un ácido orgánico tal como ácido málico (véase, por ejemplo, Documento de patente 12); y un método de estabilización de una proteína hemo con el que coexiste una albúmina deslipidada (véase, por ejemplo, Documento de patente 13).

Documento de patente 1: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-63-271160

Documento de patente 2: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-63-243756

Documento de patente 3: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-2-296149

Documento de patente 4: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-4-145366

Documento de patente 5: Publicación de solicitud de patente japonesa no examinada N.º JP-A-5-69466

Documento de patente 6: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-5-281227

Documento de patente 7: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-5-99923

Documento de patente 8: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-7-229902

Documento de patente 9: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-11-118806

Documento de patente 10: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-11-218533

Documento de patente 11: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-2001-249132

Documento de patente 12: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-2003-014768

Documento de patente 13: Publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-2003-194825

DIVULGACIÓN DE LA INVENCIÓN

Problema a resolver por la invención

Es un primer objetivo de la presente invención proporcionar un novedoso método de estabilización de una proteína hemo, que es eficaz contra la desnaturalización y degradación de una proteína hemo tal como hemoglobina. En particular, el fin de la invención es proporcionar una técnica para estabilizar eficazmente la hemoglobina que coexiste con componentes de heces que tienen fuertes actividades de desnaturalización y degradación.

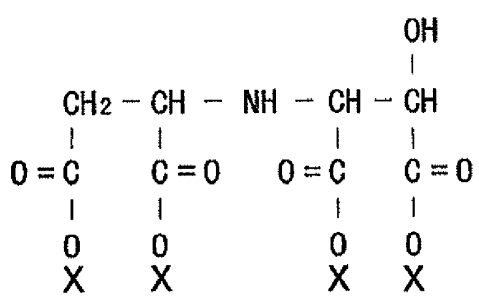
Es un segundo objetivo de la presente invención proporcionar una disolución de almacenamiento de una proteína hemo, que emplea un novedoso agente estabilizante para una proteína hemo.

Es un tercer objetivo de la presente invención proporcionar un compuesto específico para su uso en un novedoso método de estabilización de una proteína hemo.

Medios para resolver el problema

La presente invención incluye lo siguiente (1) a (4).

(1) Un método de estabilización de hemoglobina caracterizado por que comprende solubilizar un ácido iminocarboxílico o una sal del mismo en una disolución acuosa que contiene hemoglobina o en una disolución acuosa en la que se suspenden heces que contienen hemoglobina, en el que el ácido iminocarboxílico o una sal del mismo es ácido 3-hidroxi-2,2'-iminodisuccínico de fórmula (2):



(2)

donde X es un átomo de hidrógeno, un metal alcalino o un grupo amonio, o una sal del mismo.

(2) En el método de estabilización de una proteína hemo según (1) la concentración de ácido iminocarboxílico o una sal del mismo entra dentro de un intervalo de 0,001 a 0,200 mol/l.

(3) Disolución de almacenamiento en la que se suspenden heces, que comprende ácido 3-hidroxi-2,2'-iminodisuccínico de fórmula (2) o una sal del mismo para la estabilización de hemoglobina en dicha muestra de heces.

(4) Uso de ácido 3-hidroxi-2,2'-iminodisuccínico de fórmula (2) o una sal del mismo para estabilizar hemoglobina en un método según (1) o (2).

Efectos de la invención

En el método de estabilización de una proteína hemo de la presente invención, la proteína hemo puede protegerse de una sustancia biogénica que tiene fuertes actividades de desnaturalización y degradación, incluso bajo coexistencia con un componente de heces. Por consiguiente, el método es útil para estabilizar hemoglobina que está contenida en una muestra para el análisis de una sustancia biogénica, por ejemplo para la detección de sangre oculta fecal. Especialmente, el método contribuye a mantener la antigenicidad de una proteína hemo, cuando se supone que la proteína hemo se analiza inmunológicamente y se requiere proteger su estructura de antígeno. Por el compuesto usado para el método de la presente invención, la disolución de almacenamiento y el método de estabilización de una proteína hemo, la hemoglobina en muestras de heces se estabiliza eficazmente, y puede esperarse prevención de un resultado negativo falso producido por la desnaturalización y degradación de la hemoglobina.

MEJORES MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

La presente invención se describirá a continuación en más detalle.

En la presente invención, el ácido iminocarboxílico o una sal del mismo coexiste con una proteína hemo en una muestra. El ácido iminocarboxílico puede seleccionarse apropiadamente de uno muy conocido en la técnica; sin embargo, especialmente es preferible el compuesto ácido 3-hidroxi-2,2'-iminodisuccínico de fórmula (2) o una sal del mismo. Por tanto, ejemplos de un metal alcalino X de fórmula (2) incluyen litio, sodio, potasio, rubidio y cesio.

Por tanto, como el ácido iminocarboxílico usado en la presente invención puede usarse, por ejemplo, uno sintetizado por un método que usa ácido aspártico y ácido epoxisuccínico como materiales de partida (por ejemplo, publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-9-183773); un método que usa ácido maleico y amoniaco como materiales de partida (por ejemplo, patente de Estados Unidos N.º US 639863); un método que usa ácido aspártico y ácido maleico como materiales de partida (por ejemplo, publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-5-320109); un método que usa semiéster de ácido maleico; ácido maleico y amoniaco como materiales de partida (por ejemplo, publicación de solicitud japonesa N.º JP-A-8-12631).

Una concentración de ácido iminocarboxílico o una sal del mismo en una muestra que contiene una proteína hemo es 0,001 a 0,200 mol/l, más preferentemente, 0,050 a 0,150 mmol/l. Cuando la concentración de ácido iminocarboxílico o una sal del mismo es inferior a 0,001 mmol/l, un efecto de estabilización de una proteína hemo llega a ser insuficiente. Por otra parte, cuando la concentración de ácido iminocarboxílico o una sal del mismo es superior a 0,200 mmol/l, la solubilidad disminuye, y también se inhibe una inmunorreacción.

Aunque no es esencial en la presente invención, añadiendo un protector de proteína conocido según se requiera, puede potenciarse además un efecto para estabilizar la proteína hemo. Ejemplos de un protector de proteína tal incluyen una proteína inactiva tal como albúmina y gelatina.

Puede usarse cualquier albúmina; sin embargo, es especialmente preferible albúmina derivada de suero de animal o un huevo. Ejemplos específicos de la misma incluyen albúmina derivada de sangre de ganado vacuno, caballos, cabras, ovejas, cerdos, conejos y cachorros o fetos de los mismos.

Además de la albúmina descrita anteriormente, también se conoce un producto de degradación enzimática de la misma. Como albúmina de la presente invención también puede incluirse una proteína inducida de tal albúmina.

Además del protector de proteína anterior, también es eficaz la adición de diversos componentes de protector de proteína conocidos para una proteína hemo, tales como un agente antibacteriano para prevenir el crecimiento innecesario de un microorganismo, y un tampón que da pH favorable para conservar la proteína hemo.

Ejemplos de un agente antibacteriano incluyen una serie de antibióticos no de penicilina, además de enzima bacteriolítica, benzoato de etilo, penicilina, Fungizone, estreptomicina y cefamicina. Por tanto, se sabe que inhibidores de la proteasa tales como inhibidor de tripsina y alfa-2 macroglobulina también estabilizan la proteína hemo.

Un pH de un medio de dispersión se ajusta a un intervalo que permite que una proteína hemo se mantenga establemente. Bajo condiciones extremadamente ácidas o alcalinas, la estabilización de la proteína hemo puede perderse, y por tanto el pH neutro es preferible. Concretamente, el pH es 5 a 10, preferentemente aproximadamente 6 a 8.

Puede emplearse un tampón apropiado para mantener el pH. Por ejemplo, el tampón de Good, tal como ácido hidroxietilpiperazin-2-etanosulfónico (abreviado en lo sucesivo HEPES) y ácido piperazin-bis(2-etanosulfónico) (abreviado en lo sucesivo PIPES), da pH 6 a 8 que puede ser el pH más apropiado para estabilizar una estructura de la proteína hemo. Además, el tampón de Good también se utiliza como disolución de tampón de reacción para detectar la proteína hemo por una reacción inmunitaria, y puede enumerarse como un tampón especialmente preferible. Además, también puede emplearse una disolución de tampón fosfato, un disolución de tampón Tris, una disolución de tampón glicina, una disolución de tampón ácido bórico, y similares.

El método de estabilización de una proteína hemo de la presente invención puede emplearse para detectar la proteína hemo en una muestra de heces, orina o de sangre. La proteína hemo puede seleccionarse apropiadamente de proteínas que tienen hemo como sus componentes. Ejemplos de las mismas incluyen hemoglobina, mioglobina, peroxidasa o catalasa. Especialmente, contribuye a mantener la antigenicidad de una proteína hemo, cuando la proteína hemo se analiza inmunológicamente y se requiere proteger su estructura de antígeno.

La presente invención puede proporcionar una disolución de almacenamiento para hemoglobina que contiene un ácido iminocarboxílico o sales del mismo que actúa(n) de factor de estabilización de una proteína hemo.

Además, la disolución de almacenamiento de la presente invención puede contener un protector de proteína o un tampón según se necesite. El protector de proteína o el tampón pueden seleccionarse apropiadamente de los enumerados anteriormente.

La presente invención puede proporcionar un método de medición inmunológica para una proteína hemo como aplicación de la técnica de estabilización de una proteína hemo. Ejemplos del método de medición inmunológica incluyen un método de reacción de aglutinación en látex, un método de reacción de agregación de coloide de oro, inmunocromatografía y ELISA. En cualquier método de medición, la actividad del antígeno durante el almacenamiento se mantiene por la coexistencia de un ácido iminocarboxílico o sales del mismo y una proteína hemo en una muestra, y se previene la disminución del valor de medición.

El método de estabilización de una proteína hemo de la presente invención es útil para estabilizar una proteína hemo como objeto analítico que existe en una muestra biogénica. Especialmente en un método de medición de proteína hemo que utiliza un procedimiento inmunológico con un anticuerpo de reconocimiento de proteína hemo, la antigenicidad de una proteína hemo como objeto analítico está altamente estabilizada. Las heces, orina y sangre son conocidas como muestras biogénicas para detectar una proteína hemo. Especialmente, la hemoglobina en heces será un indicador de hemorragia en un sistema gastrointestinal, y la hemoglobina en orina será un indicador de hemorragia en una vía urinaria.

Cuando se aplica el método de estabilización de la presente invención a hemoglobina en una muestra de heces, se recomienda añadir un ácido iminocarboxílico o sales del mismo en una disolución de almacenamiento en la que se suspenden las heces. Normalmente, en la detección de hemoglobina en heces, las heces se suspenden en una disolución de almacenamiento apropiada, y se preparará una muestra para un análisis inmunológico por filtración según se necesite.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a ejemplos que no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo Efecto de estabilización de la hemoglobina de HIDS de diferentes concentraciones

Se preparó una disolución de almacenamiento añadiendo 0 a 0,2 mol/l de 3-hidroxi-2,2'-iminodisuccinato de tetrasodio (HIDS) de las diversas concentraciones mostradas en la Tabla 1 a una disolución (pH 7,0) que contenía 0,05 mol/l de HEPES, 0,9 % de cloruro sódico y el resto agua pura. Se usó el HIDS fabricado por Nippon Shokubai Co., LTD.

Se añadió hemoglobina hemolisada, o una mezcla de hemoglobina hemolisada y una muestra de heces a la disolución de almacenamiento, y cada disolución de prueba se midió para una concentración de hemoglobina (concentración inmediatamente después de la adición). Posteriormente, la concentración de hemoglobina de la disolución de prueba guardada a 37 ºC durante 20 horas se dividió entre la concentración inmediatamente después de la adición, y se calculó la relación residual de hemoglobina.

Se midió una concentración de hemoglobina por el analizador OC-SENSOR NEO (fabricado por Eiken Chemical Co., Ltd.) usando OC Auto III (fabricado por Eiken Chemical Co., Ltd.), que es un reactivo de medición inmunológica para hemoglobina.

Como se muestra en la Tabla 1, en la disolución de prueba en la que HIDS se añade a solo hemoglobina, se observó un efecto estabilizante mediante la adición de HIDS cuya concentración es 0,001 mol/l o más. Por tanto, en la disolución de prueba en la que coexisten hemoglobina y heces, el efecto estabilizante se observa mediante la

adición de HIDS cuya concentración es 0,005 mol/l o más. Especialmente, cuando una concentración de HIDS añadida es 0,050 mol/l o más, el efecto para estabilizar la hemoglobina fue sorprendente.

Tabla 1 Efecto de estabilización de hemoglobina de HIDS

Antígeno	Hemoglobina	Hemoglobina + muestra de heces
Concentración de HIDS añadida [mol/l]	Relación residual [%]	Relación residual [%]
-	77,7	27,5
0,001	82,8	28,8
0,005	83,9	32,3
0,010	84,2	39,2
0,050	84,1	50,8
0,075	85,2	53,9
0,100	87,8	55,9
0,150	88,2	57,8
0,200	86,2	46,3

Ejemplo comparativo

Se examinó un efecto para estabilizar hemoglobina por un método similar al método del ejemplo, excepto que se añadió ácido etilendiamina-N,N,N',N'-4-acético (EDTA), ácido iminodiacético (IDA) o ácido N-(2-hidroxietil)iminodiacético (HIDA), en lugar de 3-hidroxi-2,2'-iminodisuccinato de tetrasodio (HIDS) del Ejemplo.

Como se muestra en la Tabla 2, cuando se usó EDTA, IDA o HIDA como agente quelante, se observó un ligero efecto estabilizante en la disolución de prueba de hemoglobina sola. Sin embargo, cuando se usó IDA o HIDA como agente quelante, no se observó ningún efecto estabilizante seguro en la disolución de prueba en la que coexisten la hemoglobina y las heces. Cuando se usó EDTA, se observó un efecto ligeramente más alto para estabilizar hemoglobina incluso bajo la coexistencia de heces, sin embargo, cuando una concentración de HIDS añadida fue 0,010 mol/l o más, el efecto para estabilizar la hemoglobina fue mucho más pequeño que el efecto de la disolución de almacenamiento del ejemplo.

Tabla 2 Efecto de estabilización de hemoglobina de diversos agentes quelantes

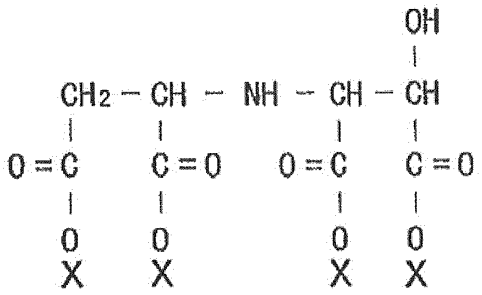
Antígeno	Hemoglobina	Hemoglobina + muestra de heces
	Relación residual [%]	Relación residual [%]
Sin agente quelante añadido	77,7	27,5
Concentración de EDTA añadida [mol/l]		
0,001	79,5	34,3
0,010	79,8	35,8
0,050	82,4	37,1
Concentración de IDA añadida [mol/l]		
0,001	82,1	28,0
0,010	80,9	27,3
0,050	81,0	26,3
Concentración de HIDA añadida [mol/l]		
0,001	80,3	26,1
0,010	79,3	26,4
0,050	81,6	27,3

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Según la presente invención, cuando un ácido iminocarboxílico o una sal del mismo coexisten con una proteína hemo en una muestra, la proteína hemo puede mantenerse establemente, y por tanto, puede prevenirse un negativo falso producido por desnaturalización y degradación de hemoglobina en una prueba de sangre oculta fecal. Como resultado, puede realizarse una prueba de sangre oculta fecal con más exactitud.

REIVINDICACIONES

1. Un método de estabilización de hemoglobina caracterizado por que comprende solubilizar un ácido iminocarboxílico o una sal del mismo en una disolución acuosa que contiene hemoglobina o en una disolución acuosa en la que se suspenden heces que contienen hemoglobina, en el que el ácido iminocarboxílico o una sal del mismo es ácido 3-'hidroxi-'2,2'-iminodisuccínico de fórmula (2):



(2)

donde X es un átomo de hidrógeno, un metal alcalino o un grupo amonio, o una sal del mismo.

2. El método de estabilización de hemoglobina según la reivindicación 1, en el que la concentración de ácido iminocarboxílico o una sal del mismo entra dentro de un intervalo de 0,001 a 0,200 mol/l.

3. Disolución de almacenamiento en la que se suspenden heces, que comprende ácido 3-hidroxi-2,2'-iminodisuccínico de fórmula (2) o una sal del mismo para la estabilización de hemoglobina en dicha muestra de heces.

4. Uso de ácido 3-hidroxi-2,2'-iminodisuccínico de fórmula (2) o una sal del mismo para estabilizar hemoglobina en un método según la reivindicación 1 o 2.