

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 737**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 27/48 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2004 PCT/GB2004/002985**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2005 WO05005657**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2004 E 04743326 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 1675960**

54 Título: **Ensayo de detección de proteasas**

30 Prioridad:

09.07.2003 GB 0316075

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

07.07.2017

73 Titular/es:

**ATLAS GENETICS LIMITED (100.0%)
SKURRAYFIELD, 34 WINGFIELD ROAD
TROWBRIDGE WILTSHIRE BA14 9ED, GB**

72 Inventor/es:

**BRAVEN, HELEN;
KEAY, RUSSELL y
FLOWER, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 622 737 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**Ensayo de detección de proteasas****CAMPO DE LA INVENCION**

5 La invención está relacionada con diversos métodos para la detección o evaluación de la actividad de la(s) proteasa(s).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las enzimas proteasas están presentes en diversos fenómenos biológicos; por ejemplo, en la activación de proteínas y en la señalización celular. La actividad de la(s) proteasa(s) -o, simplemente, 'actividad proteasa'- desempeña un papel clave en procesos como la coagulación sanguínea, la apoptosis y la regulación hormonal. Las proteasas también son esenciales para el funcionamiento de diversos patógenos víricos y microbianos. Existe un interés cada vez mayor respecto al desarrollo de inhibidores de proteasa para su uso como agentes terapéuticos.

15 Determinar la actividad proteasa en las muestras biológicas es importante para el análisis de procesos como la apoptosis, la detección o 'screening' de potenciales inhibidores de proteasa y la monitorización de la pureza de las muestras, por ejemplo durante la purificación de proteínas. Las enzimas proteasas hidrolizan amidas y ésteres para producir péptidos, aminoácidos simples o fragmentos de aminoácidos marcados, dependiendo de la estructura del sustrato y la naturaleza de la enzima. La determinación o especificación de la actividad proteasa puede realizarse utilizando un sustrato proteico que existe de forma natural o un sustrato peptídico sintético análogo que está marcado, por ejemplo con un fluoróforo o un cromóforo. La determinación de la actividad proteasa también puede realizarse utilizando un péptido corto y sintético que está marcado y que, de manera opcional, incorpora una secuencia de reconocimiento de proteasas. En algunos casos, la determinación de la actividad proteasa puede realizarse utilizando un único aminoácido marcado. En estos casos, la actividad proteasa se detecta gracias a la capacidad de la proteasa para deshacer el enlace entre el aminoácido simple y el marcador (o etiqueta) con el que está marcado (o etiquetado).

20 La naturaleza de la proteína utilizada depende de la solubilidad requerida y de los requisitos particulares de la prueba; normalmente, se utiliza albúmina de suero bovino (BSA) o caseína. También se ha utilizado gelatina, ovoalbúmina y proteínas reticuladas.

25 La mayoría de ensayos o métodos de detección presentes en el mercado utilizan un análogo de sustrato marcado. La detección de actividad proteasa puede realizarse utilizando un montaje reactivo homogéneo o heterogéneo. Normalmente, en un ensayo de detección homogéneo el sustrato está en solución y el producto también está en solución. Normalmente, los sistemas de detección basados en la fluorescencia que utilizan fluoróforos (por ejemplo, fluoresceína, rodamina o fluoróforos BODIPY) funcionan de acuerdo con uno de estos dos principios: la detección de una señal fluorescente después de la escisión de una proteína -con múltiples marcadores-
30 autoinhibida (kits de ensayos de proteasa enzCheck, Molecular Probes Inc.) o la detección de un cambio en el tamaño de la fracción/el conjugado marcados con fluorescentes utilizando técnicas de polarización de fluorescencia (Beacon®, kit de detección de la actividad proteasa, PanVera Corporation; kit de polarización enzCheck, Molecular Probes Inc.).

35 En un método de uso habitual, se utiliza un sustrato peptídico cuyo carboxilo terminal se ha marcado con un tinte o medio de contraste que tiene una funcionalidad amina. Dicho tinte puede ser un cromóforo o un fluoróforo, por ejemplo, cumarina, fluoresceína, rodamina o BODIPY (Molecular Probes Inc, apoalert™, kits de ensayo de proteasa CPP32, Clontech). El enlace amida que une el tinte y el aminoácido se rompe por medio de la proteasa para producir un derivado amina. El cambio en la estructura afecta a las características espectrales del tinte y se produce así una señal detectable. Una estrategia alternativa para conseguir una detección homogénea es usar un sustrato peptídico que está marcado en una parte de un sitio de escisión con un fluoróforo donante y, en la otra parte, con un 'quencher' receptor, que conjuntamente forman un par FRET ('transferencia de energía de resonancia de Förster' o 'transferencia de energía de resonancia fluorescente'). La escisión del péptido provoca la separación del donante y el receptor y, por lo tanto, produce un cambio en la señal fluorescente. La hidrólisis de una secuencia peptídica específica puede detectarse por medio de un análisis basado en gel (ensayo de proteasa Peptag, Promega).

40 Normalmente, en un ensayo heterogéneo se produce la escisión de un fragmento marcado con tinte respecto a un sustrato inmovilizado y, posteriormente, se realiza un análisis de la fase líquida (ProteaseSpots, Jerini, Ensayo de Proteasa Universal ProCheck™, Intergen).

45 La actividad proteasa también puede determinarse usando un sustrato proteico no modificado (es decir, que existe de forma natural). Normalmente, los ensayos que utilizan sustratos proteicos no modificados requieren la precipitación del sustrato no digerido y la posterior detección de los fragmentos proteicos escindidos. Dicha detección puede realizarse, por ejemplo, midiendo la absorbancia a 278 nm o mediante la detección de la funcionalidad amina primaria resultante. A menudo, estos métodos carecen de sensibilidad, requieren un muestreo para obtener datos cinéticos y dependen de la precipitación cuantitativa para obtener resultados precisos. De manera alternativa, la hidrólisis de las proteínas succiniladas puede detectarse siguiendo la reacción de los fragmentos peptídicos resultantes con TNBSA (ácido trinitrobenzeno sulfónico).

DE 10016775, US 4304853 y US 6495356 desvelan el uso de un marcador electroquímico para la detección de enzimas de coagulación sanguínea. EP 1808494, que es anterior según el Artículo 54(3) EPC, describe compuestos de metaloceno electroquímicamente activos.

5 A no ser que se deduzca lo contrario a partir del contexto, en lo que resta del presente documento el término 'sustrato' incluye tanto los sustratos que existen de forma natural como los sustratos sintéticos. Los sustratos sintéticos incluyen análogos sintéticos de sustratos que existen de forma natural, péptidos sintéticos que incorporan una secuencia de reconocimiento de proteasa y otros péptidos sintéticos, y aminoácidos simples. Los aminoácidos simples se consideran un sustrato porque, a pesar de que carecen de un enlace interno que puede escindirse mediante una enzima proteasa, dicho enlace puede formarse mediante la unión de un marcador.

10 Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'proteasa' pretende incluir dentro de su alcance las proteínas que se conocen como proteinasas.

15 Los términos 'péptido' y 'proteína' se usan indistintamente en el presente texto y ambos incluyen secuencias de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo aquellas con un pequeño número de residuos de aminoácidos, por ejemplo, cinco residuos o tres residuos. Los términos 'péptido' y 'proteína' incluyen tanto las moléculas hechas en celdas como las moléculas hechas mediante síntesis sin celdas. Los términos 'péptido' y 'proteína' incluyen moléculas que tienen secuencias que existen de forma natural, que son semisintéticas o que son artificiales, de manera que dichas secuencias pueden incluir aminoácidos que no existen de manera natural en proteínas. Por ejemplo, los términos 'péptido' y 'proteína' hacen referencia a una secuencia de aminoácidos de un péptido recombinante o no recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos de (i) un péptido nativo, (ii) un fragmento biológicamente activo de un péptido nativo, (iii) un péptido biológicamente activo y análogo de un péptido nativo, (iv) una variante biológicamente activa de un péptido nativo, (v) un péptido que tiene una secuencia artificial que comprende una secuencia de consenso biológicamente activa o (vi) un péptido que tiene una secuencia completamente artificial.

20 El término 'aminoácido' incluye los aminoácidos que existen de forma natural y los aminoácidos que no se dan de forma natural en las proteínas. También incluye los derivados de aminoácidos; por ejemplo, aminoácidos acilados, enzimas proteasas, amidas hidrolizadas y ésteres. Por tanto, debe entenderse que uno de los requisitos claves de un sustrato de proteasa marcado es la presencia de enlaces que puedan ser hidrolizados por enzimas proteasas. Por tanto, y de manera general, los términos 'proteína', 'péptido' y 'aminoácido' deben interpretarse en su sentido más amplio para que abarquen cualquier molécula derivada (o derivado molecular) que proporciona uno o más enlaces que pueden ser hidrolizados por enzimas proteasas. Estos enlaces hidrolizables pueden proporcionarse dentro de la estructura de la propia molécula o, de forma alternativa o adicional, pueden formarse cuando la molécula se marca mediante la unión con un marcador.

RESUMEN DE LA INVENCION

40 La invención proporciona un método para detectar la actividad proteasa en una muestra, de manera que esto conlleva poner en contacto una solución de muestra con un sustrato de proteasa(s) marcado con un marcador electroquímicamente activo, proporcionar las condiciones para que cualquier proteasa que pueda estar presente en la muestra pueda degradar el sustrato de proteasa, y determinar electroquímicamente la información relacionada con el marcador electroquímicamente activo. La información relacionada con el marcador se usa convenientemente para obtener información sobre la presencia o ausencia de actividad proteasa. Preferiblemente, la información electroquímica puede usarse para cuantificar las proporciones relativas del sustrato degradado y no degradado. Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'degradar' incluye cualquier degradación que se produzca como resultado de una actividad enzimática, por ejemplo, mediante digestión. Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'degradar' incluye la escisión o descomposición del marcador con respecto al sustrato marcado, incluso aunque no haya ninguna escisión dentro de la propia molécula de sustrato.

55 Es bien conocida la modificación de diversas moléculas biológicas con un marcador redox activo. El ferroceno es un marcador que se utiliza habitualmente para dicho propósito debido a su estabilidad y sus propiedades electroquímicas y debido a la disponibilidad de derivados de ferroceno adecuados. Por ejemplo, se sintetizó una glucosa oxidasa modificada con ferroceno en la que el ferroceno está unido covalentemente con la superficie de la glucosa oxidasa mediante una molécula espaciadora, y se descubrió que esta enzima modificada permite una transferencia de electrones más eficiente entre la enzima y el mediador (International Journal of Biological Macromolecules (1992) 14(4), 210-214). El ferroceno también se ha utilizado para marcar proteínas y facilitar así su detección mediante métodos voltamétricos (por ejemplo, BSA, avidina o citocromo P450). También se conocen las moléculas biológicas ferroceniladas que se conjugan con una segunda molécula; por ejemplo, anticuerpos de digoxina marcados con ferroceno, anti-HCG IgG marcado con ferroceno y biotina marcada con ferroceno.

60 El marcado de proteínas, péptidos o aminoácidos con ferroceno puede realizarse, por ejemplo, mediante una unión covalente de un derivado de ferroceno (que sea carboxil-, sulfhidril- o amino-reactivo) con residuos específicos de aminoácidos de la proteína. Los ejemplos de derivados de ferroceno que se han desarrollado hasta la

fecha incluyen diamidas, ésteres de succinimidilo, aldehídos, aminas primarias, iodoacetamidas y maleimididas. Los métodos conocidos para marcar proteínas con marcadores electroquímicamente activos incluyen el marcado de los grupos aminos de las proteínas. La presente invención proporciona métodos para el marcado de proteínas, péptidos y aminoácidos que incluyen métodos para el marcado mediante uno o más grupos carboxilos y también nuevos marcadores que son apropiados para el marcado mediante uno o más grupos aminos. El hecho de proporcionar métodos para marcar proteínas, péptidos y aminoácidos mediante un grupo carboxilo proporciona la ventaja de permitir la producción de sustratos marcados que tienen un extremo o terminal amino libre y sin derivatizar que puede ser necesario para desarrollar ensayos de trabajo para determinadas aminopeptidasas, que son un tipo de proteasas que degradan péptidos del terminal amino.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La aplicación de la detección electroquímica a ensayos de proteasa tiene diversas ventajas respecto a la detección fluorescente. La detección electroquímica tiene el potencial necesario para niveles muy elevados de sensibilidad y muestra un rango dinámico lineal más amplio que la fluorescencia. No es necesario que las muestras sean ópticamente claras. También hay una menor interferencia de contaminantes de fondo (muchas muestras biológicas son autofluorescentes).

La presente invención se basa en la observación de que un marcador electroquímicamente activo presenta características electroquímicas diferentes dependiendo del hecho de que esté unido o no a un residuo de aminoácido, dependiendo del hecho de que dicho residuo de aminoácido esté incorporado o no en un péptido o una proteína y dependiendo de la longitud de dicho péptido o proteína.

Bajo las circunstancias adecuadas, la actividad electroquímica de un marcador puede variar en un grado o nivel detectable después de producirse una pérdida de la unión de uno o muy pocos residuos de aminoácidos.

El tamaño y las características de una molécula a la que está unido un marcador electroquímicamente activo influyen en las características observables del marcador electroquímico. Esto puede suceder, por ejemplo, influyendo en la tasa de migración del marcador mediante difusión o en su tasa de migración en respuesta a un campo eléctrico.

La actividad electroquímica de un marcador también puede verse influida por los efectos estéricos que están relacionados con la presencia de la molécula a la que está unido. Por ejemplo, el impedimento estérico puede impedir que el marcador se aproxime a un electrodo y acepte o done electrones.

Si el marcador está unido a un péptido, la estructura secundaria del péptido (ampliamente determinada por la secuencia principal) puede influir en las propiedades físicas del marcador. Por ejemplo, si el marcador está unido a un residuo de aminoácidos en un péptido de manera que la estructura del péptido supone un impedimento estérico para el marcador electroquímicamente activo, las señales observables mediante voltametría pueden disminuir. La digestión del péptido puede destruir o liberar los elementos de la estructura secundaria y, de este modo, puede reducir o eliminar la influencia de la estructura del péptido sobre el marcador. Por consiguiente, la digestión del péptido provoca un cambio, normalmente un aumento, en la señal electroquímica producida por el segmento del marcador. En un experimento de voltametría de pulso diferencial, la respuesta de la corriente farádica -aplicando un voltaje particular- puede aumentar tras la digestión del péptido.

Las personas versadas en la materia entenderán que, puesto que la estructura secundaria de un péptido depende de la temperatura, los efectos que el péptido tiene sobre un marcador electroquímicamente activo varían con la temperatura. Una persona versada en la materia es capaz de escoger una temperatura adecuada para llevar a cabo la técnica electroquímica de la invención con el objetivo de obtener una señal óptima del índice de ruido de fondo para dicha técnica. Si la técnica está incorporada en un ensayo en el que se lleva a cabo un calentamiento o un enfriamiento, se puede obtener una medición a la temperatura deseada seleccionando simplemente un punto adecuado en el régimen de temperatura para realizar la medición.

La información relacionada con el marcador electroquímicamente activo puede obtenerse mediante voltametría o mediante un método amperométrico. La voltametría de pulso diferencial resulta particularmente apropiada. Si se desea, el proceso de detección electroquímica puede realizarse usando uno o más electrodos cubiertos con una membrana que puede excluir moléculas de forma selectiva basándose en una o más características; por ejemplo, tamaño, carga o hidrofobia. Esto puede ayudar a la hora de eliminar la corriente de ruido de fondo que proviene, por ejemplo, de los componentes cargados presentes en la solución.

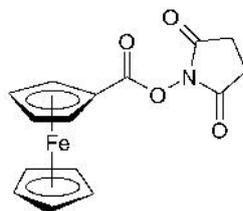
Los marcadores electroquímicamente activos que son adecuados incluyen aquellos que comprenden complejos π metalo-carbocíclicos, es decir, complejos orgánicos con electrones π parcial o totalmente deslocalizados. Los marcadores adecuados incluyen aquellos que comprenden fracciones o segmentos sándwich ('sandwich moiety', en inglés) en las que dos anillos carbocíclicos son paralelos, o compuestos sándwich plegados (compuestos angulares) y monociclopentadienilos. Preferiblemente, el marcador electroquímicamente activo es un marcador de metaloceno. Más preferiblemente, es un marcador de ferroceno.

El anillo de ferroceno o metalloceno, que constituye preferiblemente el segmento o fracción de marcado (también llamada 'fracción marcadora'; 'labelling moiety', en inglés), puede estar sin sustituir. Si se desea, la estructura del anillo de ferroceno o metalloceno puede estar sustituida con uno o más sustituyentes cuya naturaleza y posición se seleccionan para que influyan de la manera deseada en las características redox de la fracción de ferroceno o metalloceno. Además, o en vez de ello, el anillo de ferroceno o metalloceno puede estar sustituido con cualquier sustituyente anular que no reduzca sustancialmente la sensibilidad electroquímica del marcador. De forma ventajosa, los marcadores de ferrocenilo y metallocenilo pueden ser ferroceno o metalloceno carboxamidas N-sustituidas, o ferrocenilaminas o metallocenilaminas. La fracción de ferroceno o metalloceno carboxamida puede estar unida a la proteína o al péptido mediante el nitrógeno de la carboxamida. El ligamiento ('linkage', en inglés) con el péptido o la proteína puede realizarse por medio de cualquier ligamiento que sea adecuado, normalmente mediante el ligamiento con una cadena lateral de aminoácidos. Cuando el ligamiento se produce mediante un grupo amina de un aminoácido, péptido o proteína, el átomo de nitrógeno puede constituir el nitrógeno de la fracción de carboxamida. Cuando el ligamiento se produce mediante un grupo carboxilo de un aminoácido, péptido o proteína, la fracción de marcado de ferrocenilamina o metallocenilamina puede convertirse en una fracción de ferrocenilamida o metallocenilamida tras la unión con un grupo carboxilo de un aminoácido, péptido o proteína. Cuando el sustrato no marcado no contiene un enlace que puede sufrir una hidrólisis por parte de la enzima proteasa prevista, por ejemplo, cuando el sustrato no marcado es un aminoácido simple, es necesario que el ligamiento del sustrato al marcador electroquímico sea tal que provoque la formación de un enlace que puede sufrir una hidrólisis por parte de la enzima proteasa prevista. En estas circunstancias, el marcado del sustrato se llevará a cabo preferiblemente mediante una unión covalente con una fracción carboxil- o amino-reactiva del sustrato. Se han desarrollado diversos métodos sintéticos para la derivatización de cadenas laterales de proteínas, péptidos o aminoácidos, o de las porciones terminales (o restos terminales) de proteínas, péptidos o aminoácidos. Por ejemplo, los residuos de lisina en una proteína pueden derivatizarse por medio de una reacción con un éster de succinimidilo. Para la derivatización en otros residuos de aminoácidos, pueden usarse otros métodos sintéticos conocidos. Por ejemplo, puede utilizarse un agente de maleimida para derivatizar residuos de cisteína. Puede usarse un éster de N-hidroxisuccinimida para derivatizar el terminal amino o el grupo amino de la cadena lateral de una proteína o péptido, o una fracción amino de un aminoácido.

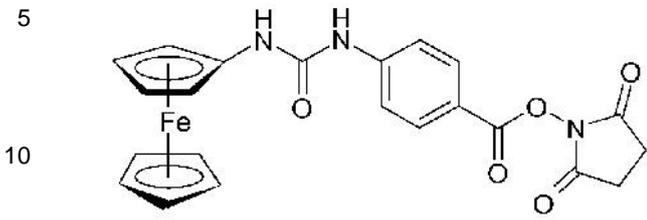
El grupo del marcador puede estar unido al sustrato de proteínas, péptidos o aminoácidos a través de una fracción o segmento enlazador ('linker moiety', en inglés). Puede utilizarse cualquier fracción enlazadora que sea adecuada. Las fracciones enlazadoras que son adecuadas pueden comprender una cadena alifática que puede ser lineal o ramificada, y saturada o no saturada. De forma ventajosa, cuando se marca una proteína, la fracción enlazadora es una cadena alifática lineal o ramificada, por ejemplo, una cadena de alquileo, que tiene entre 4 y 20 átomos de carbono, y, preferiblemente, entre 6 y 16, y especialmente entre 8 y 14 átomos de carbono, especialmente 12 átomos de carbono. Las cadenas de alquileo pueden ser sustituidas con cualquier sustituyente o pueden interrumpirse por medio de cualquier átomo o fracción siempre y cuando dicho sustituyente, átomo o fracción no reduzca sustancialmente la sensibilidad electroquímica del marcador. Sin pretender vernos limitados por la teoría, parece que la fracción enlazadora disminuye el grado en el que la estructura terciaria de un sustrato proteico interfiere estéricamente con el grupo del marcador, y viceversa. Esta teoría es coherente con la observación de que, cuando el sustrato es un aminoácido simple o un péptido corto -por ejemplo, un tripéptido-, es decir, una molécula de sustrato sin una cantidad significativa de estructura terciaria, generalmente no es necesario el uso de una fracción enlazadora.

Los ejemplos ilustrativos de los marcadores de ferrocenilo que pueden usarse de acuerdo con la invención se muestran en las Fórmulas I, II y III. En las fórmulas Ia y IIa, los marcadores de las fórmulas I y II se muestran -respectivamente- unidos al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de aminoácido de lisina de un péptido. En la fórmula IIIa, el marcador que se muestra en la fórmula III se muestra unido al aminoácido alanina. En la fórmula IIIb, el marcador que se muestra en la fórmula III se muestra unido a un tripéptido Ala-Ala-Ala. En la fórmula IIIb puede apreciarse que el terminal amino de la fracción del tripéptido de alanina es acilado. El grupo acilo, que se indica en su forma abreviada mediante 'Ac', se añadió al tripéptido durante la síntesis de la molécula que se muestra en la fórmula IIIb para proteger el terminal amino potencialmente reactivo del tripéptido. Para sintetizar algunas de las moléculas de sustrato marcadas de la invención, puede ser necesario añadir grupos de protección como un BOC (butoxicarbonilo) y un acilo a la molécula de sustrato. De manera opcional, estos grupos de protección pueden eliminarse en fases posteriores de la síntesis. Sin embargo, en algunas circunstancias puede resultar más conveniente conservar dichos grupos siempre y cuando su presencia no reduzca sustancialmente la utilidad de la molécula en el ensayo previsto.

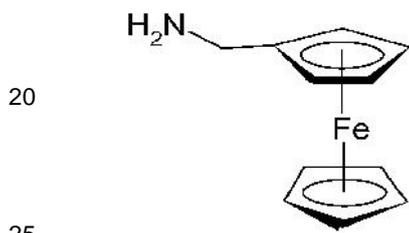
Fórmula I



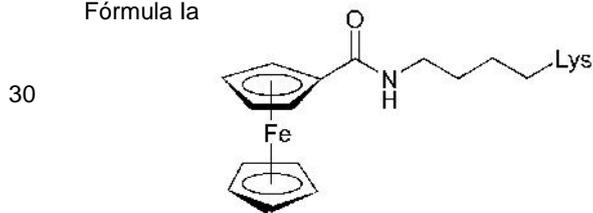
Fórmula II



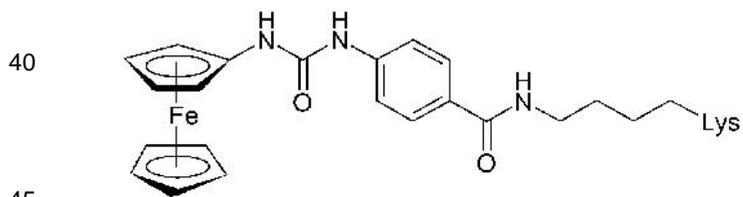
Fórmula III



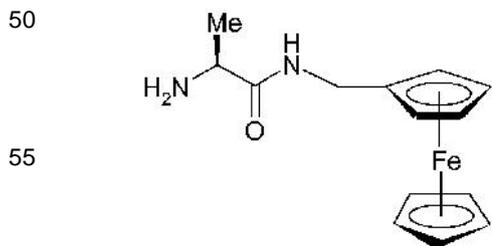
Fórmula Ia



Fórmula IIa



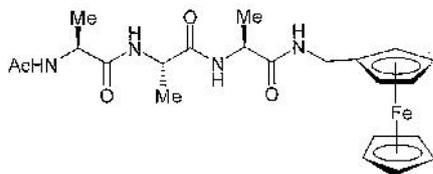
Fórmula IIIa



Fórmula IIIb

60

65



En el caso de un sustrato de péptidos o proteínas con una estructura secundaria significativa, la síntesis de un péptido o proteína -marcados- a partir de una fracción de marcado y la proteína o péptido apropiados no da como resultado, generalmente, una derivatización completa de la proteína o péptido. Muchos sitios no son accesibles para los reactivos en solución. Por ejemplo, la molécula de BSA comprende 60 residuos de lisina (Hirayama et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 173, 639-646). Según la literatura especializada, el marcado de BSA con ésteres de succinimidilo da ratios de BSA:marcador de entre 1:5 y 1:23 (Jones, L. J. Et al., *Analytical Biochem.*, 1997, 251, 144-152; e Hiroaki, S. et al., *Sensors and Actuators B*, 2000, 65, 144-146). Normalmente, el producto de reacción de una síntesis de marcado contiene una mezcla de diferentes moléculas del producto con un número diferente de marcadores. El número promedio de marcadores puede calcularse mediante diversos métodos espectroscópicos, por ejemplo, espectroscopia ultravioleta-visible. La distribución del número de marcadores por cada molécula proteica puede calcularse con más precisión utilizando la espectrometría de masas.

El número exacto de fracciones de marcado (o fracciones marcadoras) presentes en una proteína o péptido no es crítico para el éxito del ensayo de la invención. Para obtener una buena sensibilidad, preferiblemente hay de media varias fracciones de marcado en cada molécula proteica o peptídica. Sin embargo, cuando el sustrato es un aminoácido simple o un péptido corto, por ejemplo, un tripéptido, normalmente es suficiente una única fracción de marcado en cada molécula de sustrato. De hecho, algunas moléculas de sustrato pequeñas pueden contener un único grupo que es válido para el marcado con una fracción de marcado. Para el uso en ensayos con enzimas que solamente escinden o descomponen secuencias de aminoácidos particulares, es preferible que la fracción de marcado esté situada relativamente cerca del sitio de escisión de manera que el entorno inmediato del marcador se vea afectado por la escisión y sus propiedades electroquímicas observables también se vean afectadas. Los péptidos cortos sintéticos marcados y los aminoácidos simples marcados pueden ser los tipos de sustrato preferidos para ciertos ensayos de enzimas proteasas, especialmente ensayos de enzimas como aminopeptidasas y endopeptidasas. En general, se prefiere el uso de grandes proteínas marcadas, como la BSA o la caseína, en ensayos sobre la actividad proteasa general. Esto es así porque, habitualmente, las proteínas grandes contienen diversos sitios de escisión, incluyendo al menos algunos que pueden ser reconocidos por muchas de las enzimas proteasas presentes en la muestra analizada.

En determinadas circunstancias se prefiere el uso de péptidos cortos porque permite la síntesis de sustratos que solo contienen las secuencias de reconocimiento específicas para la proteasa específica o la clase de proteasas examinadas. Por ejemplo, un sustrato que incorpore un péptido corto con una secuencia Ala-Ala-Phe o Ala-Ala-Pro-Phe y, preferiblemente, muy pocas o ninguna secuencia más, puede usarse en un ensayo específico sobre la actividad de la quimotripsina. En otro ejemplo adicional, la leucina aminopeptidasa (LAP) es una enzima proteolítica que es una exopeptidasa que hidroliza los enlaces peptídicos adyacentes a un grupo amino libre. Muestra la especificidad para los enlaces peptídicos cerca de los residuos de leucina. Se observan niveles elevados de LAP en suero y orina en diversas condiciones clínicas, incluyendo colestasis, cirrosis hepática, necrosis hepática, tumores hepáticos, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer de ovarios, lupus eritematoso sistémico y tumores de células germinales de ovarios y testículos. Un sustrato que comprende un péptido corto que contiene residuos de alanina en el extremo N-terminal o un sustrato que comprende un aminoácido de alanina marcado, por ejemplo, el sustrato que se muestra en la fórmula IIIa, pueden usarse para analizar muestras de suero u orina en busca de niveles elevados de LAP con el objetivo de ayudar en el diagnóstico de una de las enfermedades enumeradas previamente.

Otras enfermedades clínicas asociadas con niveles en suero elevados de proteasas específicas incluyen el cáncer de próstata asociado con niveles en suero elevados de proteasa glandular kallikreína-2 (ver Nam et al., *J. Clin. Oncol.*, (2000) 18(5):1036-42) y el cáncer de próstata y de mama asociados con niveles elevados de antígeno específico de la próstata (PSA), una enzima serina (Black et al., *Clin. Cancer. Res.*, (2000) 6(2):467-73).

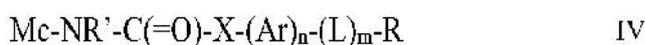
Los sustratos 'in vivo' de muchas proteasas son proteínas que comprenden varios cientos de residuos de aminoácidos. Así, el uso de un análogo de sustrato que es un péptido de longitud completa (es decir, su longitud es igual o similar a la del sustrato de la que es análogo) puede ser útil en algunas circunstancias. Por ejemplo, puede esperarse que un análogo cuya longitud es similar a la de un sustrato que existe de forma natural, y del que es análogo, tenga características (como la estabilidad y las características conformacionales) que son más similares a las del sustrato natural de lo que serían las de un análogo mucho más corto y, por lo tanto, pueden imitar o replicar el comportamiento del sustrato natural.

5 Sin embargo, en muchas circunstancias no es esencial utilizar una proteína de longitud completa. De acuerdo con la invención, el péptido comprende al menos 5 y, preferiblemente, al menos 20 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, el péptido puede comprender entre 20 y 100 residuos de aminoácidos; más preferiblemente, el péptido comprende entre 20 y 50 residuos de aminoácidos. También se desvelan métodos en los que el sustrato comprende una sola molécula de aminoácido. De acuerdo con otra realización de la invención, el sustrato comprende un péptido que tiene poco o nada más que la secuencia de reconocimiento de proteasa. A menudo, estas secuencias de reconocimiento tienen una longitud de entre 2 y 6 residuos de aminoácidos y, más preferiblemente, tienen una longitud de 3 aminoácidos. En la práctica, la longitud del péptido se selecciona de tal manera que haya al menos un sitio de escisión para la enzima o enzimas de interés. Preferiblemente, el péptido tiene un sitio de escisión diferente para la enzima o enzimas de interés. Por ejemplo, la proteasa Factor Xa requiere de la presencia de la secuencia de reconocimiento Ile-Glu-Gly-Arg en su sustrato. Los péptidos que tienen más de un sitio de escisión pueden ser útiles, por ejemplo, cuando el sustrato se va a utilizar en un análisis de actividad general de la proteasa.

15 El método de la invención puede usarse para obtener una medida cualitativa de la actividad proteasa en una muestra desconocida. La cantidad de actividad proteasa puede cuantificarse, por ejemplo, usando una curva de calibración obtenida con soluciones estándares. Si se conoce la identidad de la proteasa presente en una muestra, se puede calcular la concentración de la proteasa.

20 También se desvela un kit de ensayo de proteasa que comprende un sustrato de proteasa marcado con un marcador electroquímicamente activo. Dicho kit también puede comprender otros reactivos, por ejemplo, las soluciones adecuadas. El kit también puede incluir las instrucciones para realizar una determinación de proteasa.

25 También se desvelan péptidos o proteínas marcados y electroquímicamente activos. La divulgación proporciona compuestos de la fórmula IV,



en la que

- Mc es un grupo metalocenilo en el que cada anillo puede estar -de manera independiente- sustituido o no sustituido,
- 30 - el grupo metalocenilo comprende un ion metálico M seleccionado de un grupo que se compone de hierro, cromo, cobalto, osmio, rutenio, níquel y titanio,
- R' es H o un alquilo inferior,
- X es NR' u O,
- Ar es un grupo arilo sustituido o no sustituido,
- 35 - n es 0 ó 1,
- L es un grupo enlazador,
- m es 0 ó 1,
- R es un residuo de proteína, péptido o aminoácido.

40 La divulgación proporciona un compuesto que comprende un grupo metalocenilo unido a un grupo carboxilo de un residuo de aminoácido, péptido o proteína. El grupo carboxilo puede ser un grupo carboxilo de un terminal o una cadena lateral.

Preferiblemente, el compuesto tiene la fórmula V,



45 en la que

- Mc es un grupo metalocenilo en el que cada anillo puede estar -de manera independiente- sustituido o no sustituido,
- el grupo metalocenilo comprende un ion metálico M seleccionado de un grupo que se compone de hierro, cromo, cobalto, osmio, rutenio, níquel y titanio,
- 50 - n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12,
- X es NR' u O, y
- R' es H o un alquilo inferior.
- R es un residuo de proteína, péptido o aminoácido.

55 Los grupos de metaloceno (por ejemplo, ferroceno), incluyendo grupos de Mc de acuerdo con la fórmula IV o la fórmula V, pueden sustituirse por uno o más grupos seleccionados de alquilos inferiores (por ejemplo, de alquilo C1 a C4); alquilos inferiores sustituidos con un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido, o un grupo metaloceno adicional; arilos; o arilos sustituidos con un hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido, o un grupo metaloceno adicional. Si está presente, el grupo metaloceno adicional puede sustituirse del mismo modo que el grupo Mc, con la excepción de que el número total de grupos de Mc en la molécula preferiblemente no pase de cuatro. Preferiblemente, el grupo Mc no está sustituido.

Preferiblemente, M es un ion seleccionado de un grupo formado por hierro, osmio y rutenio. Más

preferiblemente, M es un ion de hierro. Cuando M es un ion de hierro, Mc es un ferroceno.

5 Preferiblemente, el alquilo inferior es un alquilo C₁ a C₄. Preferiblemente, R' es H. Cada R' tiene una identidad separada del otro R'.

Preferiblemente, X es NH.

10 Preferiblemente, el grupo Ar en la fórmula IV tiene al menos 5 y, por ejemplo, entre 5 y 10 anillos de átomos de carbono, de manera que se prefiere el C₆-arilo. El grupo Ar puede sustituirse con uno o más grupos seleccionados de alquilos inferiores (por ejemplo, de alquilo C₁ a C₄); alquilos inferiores sustituidos con un grupo hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido; alquenos inferiores; alquenos inferiores sustituidos con un grupo hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido; arilos; y arilos sustituidos con un grupo hidroxilo, halo, ciano, oxo, amino, éster o amido. Preferiblemente, el grupo Ar no está sustituido. Por ejemplo, Ar puede ser fenileno.

15 Preferiblemente, n=1. Preferiblemente, m=1 en la fórmula IV. En una realización preferida del compuesto de la fórmula IV, n=1 y m=1.

20 Se desvelan otros grupos enlazadores aptos para su uso en el compuesto de la fórmula IV (que se muestran en la fórmula IV como 'L'), incluyendo cualquier fracción que es adecuada para enlazar un grupo amino de una proteína con un grupo Ar o X adyacente, respectivamente, de manera que la selección de dichos grupos no supondría más que un trabajo rutinario para las personas versadas en la materia. A modo de ejemplo, el grupo enlazador L puede ser una cadena alifática que puede ser lineal o ramificada, y saturada o no saturada. De forma ventajosa, la fracción enlazadora es una cadena alifática lineal o ramificada que tiene entre 1 y 20 átomos de carbono, preferiblemente al menos 4 átomos de carbono, y, más preferiblemente, entre 6 y 16, y especialmente entre 8 y 14 átomos de carbono, más especialmente 12 átomos de carbono. La fracción enlazadora puede ser una cadena de alqueno que puede sustituirse con cualquier sustituyente o puede interrumpirse por medio de cualquier átomo o fracción siempre y cuando dicho sustituyente, átomo o fracción no reduzca sustancialmente la sensibilidad electroquímica del marcador.

25 Las realizaciones específicas preferidas son aquellos compuestos que se ilustran en las fórmulas IIa, IIIa y IIIb.

35 Preferiblemente, R es una proteína o péptido con una longitud de entre 2 y 1000 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, R puede ser un péptido con una longitud de 3 residuos de aminoácidos o un péptido con una longitud de entre 2 y 40 aminoácidos o un péptido con una longitud de entre 40 y 1000 aminoácidos. En una realización alternativa preferida, R es un aminoácido. Preferiblemente, R es una proteína que es un sustrato para una enzima proteasa. En una realización preferida, R es BSA o caseína. Otros sustratos de proteasa adecuados pueden incluir gelatina, elastina, colágeno y ovoalbúmina, cuyas formas marcadas fluorescentemente están disponibles a través de Molecular Probes, Inc.

40 De forma alternativa, R puede ser un aminoácido que existe de manera natural o un aminoácido artificial.

45 En una clase de sustrato marcado, la fracción de marcado está unida a un grupo amino que está contenido en una cadena lateral colgante de una proteína, y, preferiblemente, se encuentra en el terminal amino libre de dicha cadena lateral colgante. Esta cadena lateral puede ser una cadena lateral que forma parte de un aminoácido que existe de forma natural. Así, en la fórmula IIa de más arriba, la cadena de NH-(CH₂)₄ se deriva de la cadena de NH₂(CH₂)₄, que se encuentra presente de forma inherente en la lisina. Sin embargo, debe entenderse que, si se desea, puede introducirse sintéticamente una cadena lateral colgante adecuada en cualquier parte deseada de la proteína.

50 En otra clase de sustrato marcado, la fracción de marcado está unida a un grupo carboxilo que está contenido en la cadena lateral colgante de una proteína y, preferiblemente, está en el terminal carboxilo libre de esta cadena lateral colgante. Esta cadena lateral puede ser una cadena lateral que forma parte de un aminoácido que existe de forma natural. Sin embargo, debe entenderse que, si se desea, puede introducirse sintéticamente una cadena lateral colgante de sustrato en cualquier parte deseada de la proteína.

55 En una clase preferida de proteínas marcadas, ilustrada en la fórmula IIa mostrada previamente:

60 Mc es ferrocenilo, R' es H, X es -NH-, Ar es fenileno, L es carbonilo y n=m=1, y R representa una proteína en la que la fracción de marcado está unida al esqueleto o estructura central de la proteína mediante una cadena lateral colgante de un residuo de lisina.

65 En otra clase de sustrato marcado, la fracción de marcado puede estar unida mediante el grupo amino terminal de una proteína o aminoácido y, en ese caso, normalmente será preferible que L tenga un mínimo de cuatro

átomos de carbono, de manera que comprenda preferiblemente un grupo carbonilo que en la proteína marcada se combina con el grupo amina terminal de la proteína para formar una fracción de carboxamida.

5 En otra clase de sustrato marcado, la fracción de marcado puede estar unida mediante el grupo carboxilo terminal de una proteína o aminoácido.

10 En una clase adicional de proteína marcada, la fracción de marcado está unida mediante una cadena lateral colgante que se ha unido sintéticamente al esqueleto de la proteína y, en ese caso, normalmente L comprenderá una cadena con un mínimo de cuatro átomos de carbono, de manera que un extremo de dicha cadena tendrá -o estará interrumpido por- una fracción de carboxamida.

15 El compuesto de la divulgación puede comprender más de un grupo metaloceno. Normalmente, varios grupos de metaloceno están unidos a la misma molécula proteica o peptídica. Por ejemplo, en el caso de la BSA, puede haber entre 10 y 20 grupos de metaloceno por cada molécula de BSA. El grupo metaloceno puede estar sustituido por cualquier otro grupo marcador (o grupo de marcado) electroquímicamente activo. El compuesto puede ser un compuesto que es electroquímicamente activo o que se hace electroquímicamente activo después de una escisión parcial.

20 Sin embargo, si el sustrato marcado es relativamente pequeño, por ejemplo, si contiene un aminoácido simple o un péptido corto, por ejemplo, un tripéptido, puede que no sea necesario o factible que el sustrato comprenda múltiples fracciones de marcado.

25 Los compuestos se pueden preparar mediante la reacción de un compuesto metaloceno que comprenda un grupo funcional adecuado con una proteína, péptido o aminoácido.

30 Por ejemplo, se puede usar un éster de N-hidroxisuccinimida de un derivado (también llamado 'derivativo' o 'derivatizado') de metaloceno. Los detalles sobre cómo usar un compuesto así para marcar un péptido se proporcionan en los Ejemplos 2, 3 y 4a. Los ésteres de N-hidroxisuccinimida son adecuados para unir un marcador a las cadenas laterales de lisina. De forma alternativa, se puede usar una metaloceno metilamina, por ejemplo, una ferroceno metilamina. Los detalles sobre cómo usar un compuesto así para marcar un aminoácido y un péptido se proporcionan en los Ejemplos 4b y 4c. Sin embargo, para las personas versadas en la materia resultará evidente que se pueden unir a un péptido marcadores similares en cualquier cadena lateral adecuada mediante el uso de un grupo funcional de marcado apropiado.

35 Los compuestos de la divulgación son particularmente útiles en los métodos con arreglo a la invención. Con las condiciones que se establecen en la tabla 1, los ácidos carboxílicos de ferroceno sustituidos tienen un potencial de electrodo de alrededor de 400 mV. Por otra parte, los compuestos de metaloceno sustituidos de acuerdo con la divulgación tienen un potencial de electrodo de alrededor de 150 mV. El potencial más bajo es un potencial en el que la propensión de las impurezas de fondo para interferir con los datos recogidos es mucho menor. Así, los compuestos de la divulgación permiten obtener lecturas más precisas. En la figura 12, se muestran voltamogramas de la digestión de una molécula de BSA marcada con 4-(3'-ferrocenilureído)-1-benzoilo; en la figura 3, se muestran los voltamogramas de la digestión de una molécula de BSA marcada con ferrocenilo en las mismas condiciones de reacción. Tal y como se puede observar mediante una comparación entre las figuras 12(c) y 3(c), el pico del derivativo de 4-(3'-ferrocenilureído)-1-benzoilo con una fracción de ferroceno, tal y como se halla en las moléculas de la invención, se produce a alrededor de 100 mV, mientras que el pico del derivativo de ferrocenilo se produce a alrededor de 400 mV.

50 La invención también proporciona métodos para diagnosticar o monitorizar una enfermedad en un sujeto, lo que incluye utilizar un método de la invención para detectar una proteasa o un inhibidor de proteasas, asociados con dicha enfermedad, en un tejido o fluido corporal del sujeto.

Además, la invención proporciona el uso de un método de la invención para detectar una enfermedad en un sujeto.

55 Los ejemplos de enfermedades que están asociadas con la presencia de una proteasa o un inhibidor de proteasas en un tejido del sujeto incluyen la predisposición hereditaria a un tromboembolismo causado por deficiencias de la antitrombina III en el suero sanguíneo. Los niveles elevados de catepsina en el suero o la matriz extracelular pueden ser indicativos del Alzheimer, el cáncer o la artritis. Preferiblemente, el tejido o fluido corporal del sujeto es suero, plasma, saliva u orina, o cualquier otro tejido o fluido corporal del que se pueda obtener una muestra de forma conveniente y segura.

60 La invención también proporciona métodos para detectar un patógeno u otro organismo no deseado -por ejemplo, un organismo procedente de los desechos de los alimentos-, lo que conlleva un método de la invención para detectar en una muestra una proteasa o un inhibidor de proteasas asociados con el mencionado patógeno u organismo no deseado. Además, la invención proporciona el uso de un método de la invención para detectar un patógeno u otro organismo no deseado en una muestra. Por ejemplo, *Cochliobolus heterostrophus* es un patógeno

de las manchas de las hojas de maíz que puede diagnosticarse en una planta mediante la detección de proteasas específicas en una muestra de hojas de maíz infectadas. Hay muchos otros patógenos que se asocian con proteasas específicas, por ejemplo, Alp, la proteasa de serina en el fluido pulmonar de los humanos infectado con *Aspergillus fumigatus* y, PT, la proteasa de HIV-1 en los leucocitos humanos infectados con HIV-1.

5 La divulgación también proporciona métodos para rastrear inhibidores de proteasa. Estos métodos pueden usarse para rastrear potenciales inhibidores de proteasa con el objetivo de identificar nuevos compuestos de interés clínico.

10 La divulgación también proporciona equipos o sistemas preparados para desarrollar uno o más de los métodos desvelados en el presente texto. Dichos equipos pueden incluir electrodos, celdas electroquímicas y artículos de plástico adecuados, y equipos para detectar, registrar, manejar y mostrar o visualizar los resultados. También puede incluirse un termostato y/o dispositivo de calentamiento.

15 La divulgación proporciona un equipo que contiene una o más partes receptoras para alojar o recibir una o más muestras, medios para controlar la temperatura de las mencionadas partes receptoras de muestras y medios para medir las propiedades electroquímicas de las mencionadas muestras. El mencionado equipo puede fabricarse de modo que utilice celdas de electrodos convencionales (por ejemplo, las que se utilizan en los ejemplos incluidos en el presente texto).

20 Además, la presente divulgación proporciona un recipiente que contiene una o más partes receptoras para muestras y que sirve para contener una o más muestras. Dicho recipiente puede estar basado en el diseño de los tubos de polipropileno o de las placas de 96 pocillos, tal y como se utilizan actualmente en muchas aplicaciones de biología molecular. Idealmente, el mencionado recipiente estará adaptado para alojar al menos un componente del electrodo. Por ejemplo, el componente del electrodo puede formar parte de la cubierta del recipiente, de manera que cuando se usa para cerrar el recipiente, el/los componente(s) del electrodo llega(n) a la solución de la muestra. Normalmente, se considera que las celdas electroquímicas convencionales no son desechables debido a su coste relativamente alto. El uso de artículos de plástico desechables se ha convertido en una práctica estándar en biología molecular, ya que reduce el riesgo de contaminar las muestras.

30 Ahora se describirán en detalle algunas realizaciones ilustrativas de la invención haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

35 La Figura 1 (Fig. 1) es una representación esquemática de una celda electroquímica utilizada en las mediciones de voltametría de pulso diferencial que se describen en el presente texto;

La Figura 2 es un conjunto de espectros UV-visibles superpuestos de los conjugados y mezclas de ferroceno y BSA;

Las Figuras 3a, 3b y 3c son voltamogramas de pulso diferencial de productos de tripsina para la digestión de Fc-BSA, tal y como se describe en el Ejemplo 5A;

40 Las Figuras 4a, 4b y 4c son voltamogramas de pulso diferencial de productos de -quimotripsina para la digestión de Fc-BSA, tal y como se describe en el Ejemplo 5B;

Las Figuras 5a, 5b y 5c son voltamogramas de pulso diferencial de productos de elastasa para la digestión de Fc-BSA, tal y como se describe en el Ejemplo 5C;

45 Las Figuras 6a, 6b y 6c son voltamogramas de pulso diferencial de productos de pepsina para la digestión de Fc-BSA, tal y como se describe en el Ejemplo 5D;

Las Figuras 7a, 7b y 7c son voltamogramas de pulso diferencial de productos de Fc-BSA para la digestión de carboxipeptidasa, tal y como se describe en el Ejemplo 5E;

Las Figuras 8a, 8b y 8c son voltamogramas de pulso diferencial de productos de termolisina para la digestión de Fc-BSA (a 37° C), tal y como se describe en el Ejemplo 5F;

50 Las Figuras 9a, 9b y 9c son voltamogramas de pulso diferencial de productos de termolisina para la digestión de Fc-BSA (a 70° C), tal y como se describe en el Ejemplo 5G;

Las Figuras 10a y 10b son voltamogramas de pulso diferencial de productos de tripsina para la digestión de BSA sin marcar, tal y como se describe en el Ejemplo 5H;

55 Las Figuras 11a, 11b y 11c son voltamogramas de pulso diferencial de productos de tripsina para la digestión de FcU-BSA, tal y como se describe en el Ejemplo 5I;

Las Figuras 12a, 12b y 12c son voltamogramas de pulso diferencial de productos de papaína para la digestión de FcU-BSA, tal y como se describe en el Ejemplo 5J;

Las Figuras 13a, 13b y 13c son voltamogramas de pulso diferencial de productos de tripsina para la digestión de FcU-caseína, tal y como se describe en el Ejemplo 5K;

60 La Figura 14 muestra voltamogramas de pulso diferencial superpuestos de productos de tripsina para la digestión de Fc-BSA realizados con diversas concentraciones enzimáticas, tal y como se describe en el Ejemplo 6;

La Figura 15 muestra voltamogramas de pulso diferencial superpuestos de productos de tripsina para la digestión de Fc-BSA realizados con diversos tiempos de incubación, tal y como se describe en el Ejemplo 7;

65 La Figura 16 muestra voltamogramas de pulso diferencial superpuestos de productos de tripsina para la digestión de Fc-BSA realizados con diversas concentraciones de los inhibidores de proteasa presentes, tal y

como se describe en el Ejemplo 8;

La Figura 17 muestra las trazas o huellas amperométricas superpuestas de la digestión de Fc-BSA por medio de la tripsina durante un periodo de tiempo;

La Figura 18 muestra las señales amperométricas superpuestas de la digestión de FcU-BSA por medio de la papaína durante un periodo de tiempo;

La Figura 19a muestra las trazas superpuestas de los voltamogramas de pulso diferencial de la alanina marcada con ferroceno (Fc-Ala), antes y después de la digestión con aminopeptidasa, tal y como se describe en el Ejemplo 10;

La Figura 19b muestra los valores de referencia de la Figura 19a corregidos;

La Figura 20a muestra las trazas superpuestas de los voltamogramas de pulso diferencial del péptido de trialanina marcado con ferroceno (Ac-Ala-Ala-Ala-Fc), antes y después de la digestión con elastasa, tal y como se describe en el Ejemplo 11;

La Figura 20b muestra los valores de referencia de la Figura 20a corregidos.

En referencia a la Figura 1 (Fig. 1), una celda electroquímica 1 adecuada para usarse en los experimentos de voltametría cíclica descritos en el presente texto comprende un recipiente 2, que contiene una solución de electrolitos de fondo 3, que es una solución acuosa de 100 mM de cloruro de sodio. En la solución 3 hay una cámara 4 inmersa en la que se localiza la muestra que se va a analizar e, inmersa en ella, hay un electrodo de trabajo 5 - vítreo y de carbono-. De manera alternativa, puede usarse un electrodo de oro. También inmerso en la solución 3, hay un contraelectrodo 6 de alambre de platino y un electrodo de referencia 7 de plata/cloruro de plata inmerso en una solución de 4M de cloruro de potasio, de manera que las soluciones se comunican entre sí mediante un disco sinterizado.

Los ejemplos que se ofrecen a continuación ilustran la invención:

MATERIALES Y MÉTODOS – Preparaciones y ensayos de BSA ferrocenilada

Se adquirió albúmina de suero bovino (o BSA) (polvo liofilizado, aproximadamente 99%), caseína (leche bovina, polvo purificado), tripsina de páncreas porcino (1120 unidades de BAEE/mg de sólido), -quimotripsina de páncreas bovino de tipo II (51 unidades/mg de sólido), pepsina de mucosa estomacal porcina (632 unidades/mg de sólido), termolisina de *Bacillus thermoproteoliticus rokko* (44 unidades/mg de sólido), proteinasa K de *Tritirachium album* (33 unidades/mg de sólido), papaína de látex de papaya (14 unidades/mg de proteína, 99%), inhibidor de tripsina de soja de tipo I-S, aminopeptidasa (entre 50 y 150 unidades/mg de proteína) y elastasa (\geq 50 unidades/mg de proteína) por medio de Sigma.

Se adquirió ácido carboxílico de ferroceno por medio de Aldrich Chemical Co.

Se adquirió bicarbonato de potasio (reactivo A.C.S.), carbonato de potasio (un mínimo de 99%) y dimetilsulfóxido (reactivo A.C.S., un mínimo de 99,9%) por medio de Sigma.

Se adquirieron columnas de NAP-10 (Grado de ADN, Sephadex, G-25) por medio de Amersham Biosciences. Se adquirió Trizma hidrócloruro (+99%), Trizma base (+99%), cloruro de sodio (SigmaUltra, mínimo de 99,5%), acetato de sodio (grado de biología molecular), sal tetrasódica de ácido etilendiaminotetraacético (SigmaUltra, mínimo de 99,0%), hidróxido de sodio (SigmaUltra, mínimo de 98%), hidrócloruro de DL-cisteína (mínimo de 98%), ácido hidróclórico y agua de grado de biología molecular por medio de Sigma. Se adquirió persulfato de amonio (reactivo para electroforesis) de Ponceau S (grado práctico), N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1), 30% de solución y gel reactivo de tinción azul EZ por medio de Sigma. Se adquirió ácido acético (glacial, +99,99%) por medio de Aldrich y se adquirió isopropanol por medio de Hayman. Se adquirió membrana de biodina C por medio de Pall Life Sciences.

Las incubaciones se realizaron utilizando un controlador térmico programable PTC-100 (MJ Research Inc.).

Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada y esterilizada en autoclave (sistema WaterPro, Labconco).

MATERIALES Y MÉTODOS – Detección electroquímica

Los siguientes artículos se adquirieron por medio de BAS, Congleton, Cheshire, Reino Unido:

Electrodo de trabajo, vítreo y de carbono (número de catálogo MF-2012)

Electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (número de catálogo MF-2079)

Contraelectrodo (o electrodo auxiliar) de alambre de platino (número de catálogo MW-4130)

Celda de bajo volumen (número de catálogo MF-2040) que contiene un vial de voltametría de vidrio y una cámara de muestras de vidrio, con punta de Vycor reemplazable.

5 La estación de trabajo electroquímica de AutoLab (PGSTAT 30 con analizador de respuesta de frecuencia o μ AutoLab de tipo II) se adquirió por medio de Windsor Scientific, Slough, Berkshire, Reino Unido.

EJEMPLO 1 – Voltametría cíclica

10 Este ejemplo describe el método de voltametría cíclica utilizado en los Ejemplos 5 a 11 de más adelante.

15 La celda de bajo volumen de la Figura 1 se llenó con aproximadamente 10 ml de solución de cloruro de sodio (100 mM). Una alícuota de 200 μ l de la muestra para analizar se colocó en la cámara para muestras de cristal, que después se colocó en la celda de bajo volumen junto con el electrodo de referencia y el contraelectrodo. Los electrodos se conectaron a la estación de trabajo electroquímica de AutoLab y se realizó una voltametría de pulso diferencial usando los parámetros que se describen en la Tabla 1. Previamente al análisis, el electrodo de trabajo vítreo y de carbono se pulió (utilizando un kit de pulido de BAS, número de catálogo MF-2060) y posteriormente se acondicionó. El acondicionamiento del electrodo incluye una voltametría cíclica, alternando entre ± 1 voltios con el 'buffer' de fondo apropiado.

20 Tabla 1. Parámetros de la voltametría de pulso diferencial

Parámetro	Barrido anódico
Potencial de acondicionamiento (V)	0
Duración del acondicionamiento (s)	10
Potencial de deposición (V)	0
Duración de la deposición (s)	0
Tiempo de estabilización (s)	0
Tiempo de modulación (s)	0,04
Tiempo de intervalo (s)	0,1
Potencial inicial (V)	-0,1
Potencial final (V)	0,7
Potencial de paso (V)	0,003
Amplitud de modulación (V)	0,05

EJEMPLO 2 – Síntesis de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido ferrocenocarboxílico

55 El ácido ferrocenocarboxílico (303 mg, 1,32 mmol) y la N-hidroxisuccinimida (170 mg, 1,47 mmol) se disolvieron en dioxano (15 ml) y se añadieron, removiendo, a una solución de dicitlohexilcarbodiimida (305 mg, 1,48 mmol) en dioxano (3 ml). La mezcla se removió a temperatura ambiente durante 24 horas, y durante ese periodo de tiempo se formó un precipitado. El precipitado se extrajo mediante filtración, el solvente se extrajo del filtrado en vacío ('in vacuo') y el sólido resultante se depuró mediante cromatografía de columna con gel de sílice, eluyendo con gasolina:acetato de etilo (8:2). Rendimiento: 320 mg, 74%.

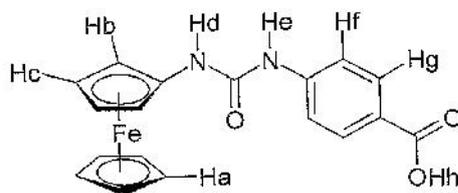
EJEMPLO 3a – Síntesis de azida de ferroceno carbonilo

65 La azida de ferroceno carbonilo se preparó a partir de ácido ferrocenocarboxílico mediante reacción con cloruro de

oxalilo y azida de sodio.

EJEMPLO 3b – Síntesis de ácido 4-(3'-ferrocenilureído)-1-benzoico

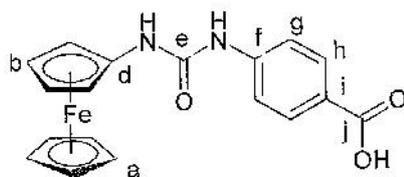
5



VIa

10

15



VIb

20

25

30

Un matraz de fondo redondo purgado se llenó con azida de ferroceno carbonilo (300 mg, 1,18 mmol, equiv. de 1,00), ácido 4-aminobenzoico (244 mg, 1,78 mmol, equiv. de 1,50) y 1,4-dioxano (40 ml) bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se removió bajo nitrógeno en un baño de 100° C durante 2 h 50 min. y, posteriormente, se dejó que se enfriara a temperatura ambiente. Se añadieron 2M de HCl (100 ml) a la mezcla de reacción y el producto se extrajo y se añadió a acetato de etilo (150 ml). Esta fase se lavó con 2M de HCl (100 ml), se secó con sulfato de sodio y se concentró en vacío para obtener el producto. Un secado adicional en un horno de vacío produjo cristales naranjas (413 mg, 96%). ¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO) 3,96 (2H, b, Hc), 4,14 (5H, s, Ha), 4,53 (2H, b, Hb), 7,54 (2H, m, Hf), 7,85 (2H, m, Hg), 7,98 (1H, s, Hd), 8,87 (1H, s, He), 12,57 (1H, s, Hh), donde la posición de cada hidrógeno es tal y como se muestra en la fórmula Va. ¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO) 61,0 64,1 66,7 68,1 (Ca,d), 117,2 (Cg), 123,5 (Cj), 130,9 (Ch), 144,6 (Cf), 152,8 (Ce), donde la posición de cada carbono es tal y como se muestra en la fórmula VIb.

35

EJEMPLO 3c – Síntesis de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 4-(3'-ferrocenilureído)-1-benzoico

40

45

50

Se disolvió dicitohexilcarbodiimida (DCC) (194 mg, 0,939 mmol, equiv. de 1,14) en 1,4-dioxano anhidro (2 ml) y se añadió a un matraz de fondo redondo purgado, bajo nitrógeno. Se añadió N-hidroxisuccinimida (108 mg, 0,939 mmol, equiv. de 1,14). Se disolvió ácido 4-(3'-ferrocenilureído)-1-benzoico (300 mg, 0,823 mmol, equiv. de 1,0) en 1,4-dioxano anhidro (13 ml) y se añadió al matraz gota a gota. La solución se removió a temperatura ambiente durante 23 horas. Se extrajo una pequeña cantidad de un sólido marrón claro de la mezcla de reacción roja/naranja mediante filtración Buchner. Se añadieron agua (100 ml) y acetato de etilo (50) a la mezcla de reacción. Se separó la fase de acetato de etilo y la parte acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 ml). Se combinaron las fases de acetato de etilo, se secaron con sulfato de sodio y se concentraron en vacío para obtener el producto crudo en forma de aceite naranja, que se purificó utilizando cromatografía flash de sílice con un sistema de gradiente desde acetato de etilo 60/éter de petróleo (punto de ebullición: 40-60° C) hasta acetato de etilo. El secado en un horno de vacío produjo éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 4-(3'-ferrocenilureído)-1-benzoico en forma de finos cristales naranjas (237 mg, 66%). R_f (acetato de etilo/éter de petróleo a 5:1) (punto de ebullición: 40-60° C) = 0,41 ¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO) 2,88 (4H, s, Hh), 3,98 (2H, t, j = 1,8 Hz, Hc), 4,16 (5H, s, Ha), 4,55 (2H, t, j = 1,8 Hz, Hb), 7,68 (2H, m, Hf), 8,00 (2H, m, Hg), 8,11 (1H, s, Hd), 9,16 (1H, s, He). ¹³C-NMR (75,5 MHz, d₆-DMSO) 25,9 (Ci), 61,1 64,2 (Cb y Cc), 69,1 (Ca), 117,7 (Cg), 131,9 (Ch), 170,9 (Ck). Espectrometría de masas (FAB(bombardamiento rápido de átomos)+ m/z) 462,07 [M+H].

EJEMPLO 4a – Síntesis de proteínas ferroceniladas

55

En el presente texto se sigue la siguiente nomenclatura:

- Fc = grupo metanoilo de ferroceno, de manera que Fc-OH es ácido carboxílico de ferroceno y Fc-NHR es un compuesto de metilamida de ferroceno.

60

- FcU = grupo 4-(3'-ferrocenilureído)-1-benzoilo, de manera que FcU-OH es ácido 4-(3'-ferrocenilureído)-1-benzoico y FcU-NHR es un compuesto de 4-(3'-ferrocenilureído)-1-benzamida.

- BSA = albúmina de suero bovino

65

Se utilizó el mismo procedimiento general para la síntesis de todas las proteínas marcadas con ferroceno. La síntesis de Fc-BSA se describe a modo de ejemplo.

La BSA liofilizada se puso de nuevo en suspensión (o se resuspendió) con el volumen correcto de solución amortiguadora de $K_2CO_3/KHCO_3$ (200 mM, pH 8.5) para obtener una concentración de BSA de 10 mgml^{-1} . La solución de BSA ($100 \mu\text{l}$, 10 mgml^{-1}) se añadió lentamente -mezclando en vortex- a una solución de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido ferrocenocarboxílico en DMSO ($100 \mu\text{l}$, 375 nM). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después se diluyó con tris HCl ($800 \mu\text{l}$, 100 mM , pH 7.8) y se purificó usando dos columnas de NAP 10 (siguiendo el protocolo suministrado), eluyendo primero con tris HCl ($800 \mu\text{l}$, 100 mM , pH 7.8) y después con agua desionizada.

La concentración de BSA se determinó por 'blotting' en Biodina C utilizando concentraciones estándares de BSA y una tinción con Ponceau S. Usando el método, se descubrió que las concentraciones de BSA eran de 0,3-0,6 mgml^{-1} . La presencia del marcador de ferroceno se confirmó mediante análisis voltamétrico.

Las proteínas marcadas con FcU se prepararon de forma análoga.

El número promedio de grupos de ferroceno presentes en cada molécula de BSA marcada se analizó mediante espectroscopia ultravioleta-visible. El espectro UV-visible del conjugado de Fc-BSA obtenido mediante el procedimiento descrito previamente se comparó con los espectros de las mezclas de Fc/BSA en diversos ratios. Los espectros superpuestos se muestran en la Figura 2, en la que la línea A es el espectro de la muestra; la línea B es del ácido de BSA:Fc-OH a 20:1; la línea C es de la BSA sola; la línea D es del Fc-OH solo y la línea E es del BSA:Fc-OH a 10:1. Tomando en cuenta estos datos, se estima que el número de moléculas de ferroceno presentes por cada molécula de BSA es de entre 10 y 20.

EJEMPLO 4b – Síntesis de alanina ferrocenilada (Fc-Ala, fórmula IIIa)

Dos equivalentes de EDCL (1-[3-(Dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida clorhidrato) se añadieron -removiendo vigorosamente- a una suspensión de ferroceno metilamina y Boc-Ala-OH (N-Boc-alanina) con 2,1 equivalentes de DMAP (4-(N,N-dimetilamino)piridina) en DCM (diclorometano) seco bajo N_2 . La reacción se removió durante la noche. Después, la reacción se diluyó con DCM y se vertió en 1N de HCL. Las capas se separaron y la capa orgánica se secó con $MgSO_4$, se filtró y se extrajo el solvente.

EJEMPLO 4c – Síntesis de péptido de trialanina ferrocenilado (Fc-Ala-Ala-Ala, fórmula IIIb)

El Ac-Ala-Ala-Ala-OH se adquirió por medio de Sigma-Aldrich.

Dos equivalentes de EDCL (1-[3-(Dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida clorhidrato) se añadieron -removiendo vigorosamente- a una suspensión de ferroceno metilamina y Ac-Ala-Ala-Ala-OH (trialanina con acetilación del grupo amino terminal) con 2,1 equivalentes de DMAP (4-(N,N-dimetilformamida) bajo N_2 . La reacción se removió durante la noche. Después se añadió metanol y el producto se precipitó usando $CHCl_3$ y se obtuvo mediante centrifugado, decantando el sobrenadante y lavando con más $CHCl_3$. No se realizó ninguna desprotección del grupo amino terminal acetilado.

EJEMPLO 5 – Ensayos de proteasa

A menos que se indique lo contrario, los ensayos de proteasa se realizaron tal y como se explica a continuación. Las enzimas liofilizadas se resuspendieron para obtener una concentración de 10 mgml^{-1} . Las enzimas se resuspendieron en las siguientes soluciones: HCl (1 mM, pH 3.0) (tripsina, -quimotripsina, pepsina), NaCl (100 mM) (proteínasa K, elastasa, papaína, carboxipeptidasa, termolisina). Se usaron $75 \mu\text{l}$ de solución de Fc-BSA ($0,3-0,6 \text{ mgml}^{-1}$) para cada reacción. Cada reacción se realizó en un volumen total de $200 \mu\text{l}$ y las reacciones se llevaron a cabo en los siguientes 'buffers' o soluciones amortiguadoras (se ofrecen las concentraciones finales): 100 mM de tris HCl, pH 7.8 (tripsina, -quimotripsina, termolisina, proteínasa K); 100 mM de tris HCl, pH 8.5 (elastasa); 200 mM de acetato de sodio, 200 mM de cisteína, 20 mM de EDTA (papaína); 10 mM de HCl, pH 2,0 (pepsina); 25 mM de tris HCl, pH 7.5, 500 mM de NaCl (carboxipeptidasa). Se añadieron $2 \mu\text{l}$ de enzimas (10 mgml^{-1}) a la mezcla de reacción de $200 \mu\text{l}$. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora. Los productos de reacción se analizaron mediante voltametría de pulso diferencial, tal y como se describe en el Ejemplo 1.

Presentación de Datos

Además de los datos brutos, los datos o valores de referencia corregidos (también llamados 'datos de línea de base corregida') se muestran como archivos superpuestos. Los datos de referencia corregidos se obtuvieron usando un GPES Manager (Ecochemie BV, Utrecht, Países Bajos), seleccionando 'corrección de la línea de base' ('baseline correction') en el menú de edición de datos, y seleccionando 'media móvil' y 'ancho máximo más pequeño' ('minimum peak width') de 0,003 V.

EJEMPLO 5A – Digestión de Fc-BSA con tripsina

Se realizó una digestión de Fc-BSA con tripsina tal y como se ha explicado previamente. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 3, en la que (a) es la traza o rastro del producto

digerido; (b) es la traza del producto de un control sin tripsina y (c) muestra los datos de (a) y (b) con la corrección de la línea de base. En la reacción positiva, la posición máxima o posición pico ('peak position', en inglés) es de 435 mV y la altura máxima o altura pico ('peak height', en inglés) es de $4,58 \times 10^{-7}$ A; en la reacción del control sin tripsina, la posición máxima es de 432 mV y la altura máxima es de $2,55 \times 10^{-8}$ A.

5 Como se observa en la Figura 3, la corriente observada a 435 mV aumenta en un factor de 18 tras la digestión de la proteína a la que está unido el marcador electroquímico.

EJEMPLO 5B – Digestión de Fc-BSA con α -quimotripsina

10 Se realizó una digestión de Fc-BSA con α -quimotripsina tal y como se ha explicado previamente. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 4, en la que (a) es la traza o rastro del producto digerido; (b) es la traza del producto de un control sin α -quimotripsina y (c) muestra los datos de (a) y (b) con la corrección de la línea de base. En la reacción positiva, la posición máxima es de 438 mV y la altura máxima es de $4,48 \times 10^{-7}$ A; en la reacción del control sin α -quimotripsina, la posición máxima es de 432 mV y la altura máxima es de $2,55 \times 10^{-8}$ A.

EJEMPLO 5C – Digestión de Fc-BSA con elastasa

20 Se realizó una digestión de Fc-BSA con elastasa tal y como se ha explicado previamente. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 5, en la que (a) es la traza o rastro del producto digerido; (b) es la traza del producto de un control sin elastasa y (c) muestra los datos de (a) y (b) con la corrección de la línea de base. En la reacción positiva, la posición máxima es de 430 mV y la altura máxima es de $2,57 \times 10^{-7}$ A; en la reacción del control sin elastasa, la posición máxima es de 432 mV y la altura máxima es de $2,55 \times 10^{-8}$ A.

EJEMPLO 5D – Digestión de Fc-BSA con pepsina

25 Se realizó una digestión de Fc-BSA con pepsina tal y como se ha explicado previamente. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 6, en la que (a) es la traza o rastro del producto digerido; (b) es la traza del producto de un control sin pepsina y (c) muestra los datos de (a) y (b) con la corrección de la línea de base. En la reacción positiva, la posición máxima es de 537 mV y la altura máxima es de $8,90 \times 10^{-8}$ A; en la reacción del control sin pepsina, la posición máxima es de 522 mV y la altura máxima es de $4,19 \times 10^{-8}$ A.

EJEMPLO 5E – Digestión de Fc-BSA con carboxipeptidasa

35 Se realizó una digestión de Fc-BSA con carboxipeptidasa tal y como se ha explicado previamente. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 7, en la que (a) es la traza o rastro del producto digerido; (b) es la traza del producto de un control sin carboxipeptidasa y (c) muestra los datos de (a) y (b) con la corrección de la línea de base. En la reacción positiva, la posición máxima es de 435 mV y la altura máxima es de $1,31 \times 10^{-7}$ A; en la reacción del control sin carboxipeptidasa, la posición máxima es de 427 mV y la altura máxima es de $6,86 \times 10^{-8}$ A.

EJEMPLO 5F – Digestión de Fc-BSA con termolisina a 37° C

45 Se realizó una digestión de Fc-BSA con termolisina, tal y como se ha explicado previamente, de manera que la incubación de la digestión se realizó a 37° C. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 8, en la que (a) es la traza o rastro del producto digerido; (b) es la traza del producto de un control sin termolisina y (c) muestra los datos de (a) y (b) con la corrección de la línea de base. En la reacción positiva, la posición máxima es de 429 mV y la altura máxima es de $1,62 \times 10^{-8}$ A; en la reacción del control sin termolisina no se halló ningún pico o máximo.

EJEMPLO 5G – Digestión de Fc-BSA con termolisina a 70° C

55 Se realizó una digestión de Fc-BSA con termolisina, tal y como se ha explicado previamente, de manera que la incubación de la digestión se realizó a 70° C. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 9, en la que (a) es la traza o rastro del producto digerido; (b) es la traza del producto de un control sin termolisina y (c) muestra los datos de (a) y (b) con la corrección de la línea de base. En la reacción positiva, la posición máxima es de 455 mV y la altura máxima es de $2,0 \times 10^{-8}$ A; en la reacción del control sin termolisina no se halló ningún pico.

EJEMPLO 5H – Digestión de BSA con tripsina

60 Se realizó una digestión de BSA sin marcar con tripsina de la misma manera que con las moléculas marcadas, tal y como se ha explicado previamente. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 10, en la que (a) es la traza o rastro de la reacción de un control sin tripsina y (b) es la traza de la reacción de BSA con tripsina. No se halló ningún pico en ninguna solución de productos de reacción.

65

EJEMPLO 5I – Digestión de FcU-BSA con tripsina

5 Se realizó una digestión de FcU-BSA con tripsina tal y como se ha explicado previamente. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 11, en la que (a) es la traza o rastro del producto digerido; (b) es la traza del producto de un control sin tripsina y (c) muestra los datos de (a) y (b) con la corrección de la línea de base. En la reacción positiva, la posición máxima es de 97 mV y la altura máxima es de $5,01 \times 10^{-7}$ A; en la reacción del control sin tripsina no hubo ningún pico.

10 EJEMPLO 5J – Digestión de FcU-BSA con papaína

15 Se realizó una digestión de FcU-BSA con papaína tal y como se ha explicado previamente. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 12, en la que (a) es la traza o rastro del producto digerido; (b) es la traza del producto de un control sin papaína y (c) muestra los datos de (a) y (b) con la corrección de la línea de base. En la reacción positiva, la posición máxima es de 93 mV y la altura máxima es de $2,62 \times 10^{-7}$ A; en la reacción del control sin papaína no se detectó ningún pico.

EJEMPLO 5K – Digestión de FcU-caseína con tripsina

20 Se realizó una digestión de FcU-caseína con tripsina tal y como se ha explicado previamente. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 13, en la que (a) es la traza o rastro del producto digerido; (b) es la traza del producto de un control sin tripsina y (c) muestra los datos de (a) y (b) con la corrección de la línea de base. En la reacción positiva, la posición máxima es de 148 mV y la altura máxima es de $3,79 \times 10^{-7}$ A; en la reacción del control sin tripsina, la posición máxima es de 147 mV y la altura máxima es de $1,55 \times 10^{-7}$ A.

25 EJEMPLO 6 – Variación de la señal del marcador electroquímico según la concentración enzimática

30 Se realizaron cinco digestiones de Fc-BSA con tripsina usando el protocolo descrito previamente. Tal y como se explica en el protocolo general, se usaron 2 µl de enzimas por cada 200 µl de reacción; en la reacción (i) se usó una solución enzimática de 10 mg/ml; reacción (ii): 1 mg/ml; reacción (iii): 0,1 mg/ml; reacción (iv): 0,01 mg/ml; y la reacción (v) fue un control sin tripsina. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 14 con la corrección de la línea de base. En la reacción (i), la posición máxima es de 430 mV y la altura máxima es de $5,42 \times 10^{-7}$ A; en la reacción (ii), la posición máxima es de 428 mV y la altura máxima es de $2,29 \times 10^{-7}$ A; en la reacción (iii), la posición máxima es de 429 mV y la altura máxima es de $1,04 \times 10^{-7}$ A; en la reacción (iv), la posición máxima es de 429 mV y la altura máxima es de $7,53 \times 10^{-8}$ A; en la reacción de control sin tripsina, la posición máxima es de 448 mV y la altura máxima es de $3,17 \times 10^{-9}$ A.

40 Tal y como se observa en la Figura 14, la magnitud de señal del voltamograma de pulso diferencial depende en gran medida de la concentración enzimática presente en el experimento de digestión. Pueden usarse diversas diluciones en serie -como las aquí descritas- para obtener datos de una curva de calibración estándar. Dicha curva es útil para cuantificar los niveles enzimáticos o las actividades enzimáticas en una muestra experimental cuyo contenido de proteasa es desconocido.

45 EJEMPLO 7 – Variación de la señal del marcador electroquímico según el tiempo de incubación

50 Se realizaron cinco digestiones de Fc-BSA con tripsina usando el protocolo descrito previamente. En la reacción (i) la incubación a 37° C se realizó durante 60 minutos; en la reacción (ii), durante 15 minutos; en la reacción (iii), durante 5 minutos; en la reacción (iv), durante 2 minutos; y la reacción (v) fue un control sin tripsina de 0 minutos. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 15 con la corrección de la línea de base. En la reacción (i), la posición máxima es de 435 mV y la altura máxima es de $2,49 \times 10^{-7}$ A; en la reacción (ii), la posición máxima es de 429 mV y la altura máxima es de $1,88 \times 10^{-7}$ A; en la reacción (iii), la posición máxima es de 435 mV y la altura máxima es de $1,57 \times 10^{-7}$ A; en la reacción (iv), la posición máxima es de 428 mV y la altura máxima es de $1,04 \times 10^{-7}$ A; en la reacción de control sin tripsina, la posición máxima es de 460 mV y la altura máxima es de $2,11 \times 10^{-8}$ A.

55 Tal y como se observa en la Figura 15, cuanto mayor sea el tiempo de incubación, mayor será la magnitud de señal del voltamograma de pulso diferencial.

60 EJEMPLO 8 – Los efectos de un inhibidor de proteasa sobre la señal del marcador electroquímico

65 Se realizaron cinco digestiones de Fc-BSA con tripsina usando el protocolo descrito previamente. Además, se añadió un inhibidor de tripsina de soja a las mezclas de reacción (i) a (iv). Las soluciones del inhibidor de tripsina de soja se prepararon resuspendiendo el inhibidor -tal y como se había proporcionado- en agua desionizada hasta una concentración de 10 mg/ml y 1 mg/ml, según correspondiera. No se añadió ningún inhibidor a la reacción (i); se añadieron 0,5 µl de una solución inhibidora de 1 mg/ml a la reacción (ii); se añadieron 0,5 µl de una solución inhibidora de 10 mg/ml a la reacción (iii); se añadieron 5 µl de una solución inhibidora de 10 mg/ml a la reacción (iv);

y se añadieron 5 µl de una solución inhibidora de 10 mg/ml a una reacción de control sin tripsina. Los resultados del voltamograma de pulso diferencial se muestran en la Figura 16 con la corrección de la línea de base. En la reacción (i), la posición máxima es de 439 mV y la altura máxima es de $2,56 \times 10^{-7}$ A; en la reacción (ii), la posición máxima es de 435 mV y la altura máxima es de $2,12 \times 10^{-7}$ A; en la reacción (iii), la posición máxima es de 430 mV y la altura máxima es de $1,60 \times 10^{-7}$ A; en la reacción (iv), la posición máxima es de 426 mV y la altura máxima es de $5,33 \times 10^{-8}$ A; en la reacción de control sin tripsina, la posición máxima es de 429 mV y la altura máxima es de $2,75 \times 10^{-8}$ A.

Tal y como se observa en la Figura 16, la magnitud de señal del voltamograma de pulso diferencial depende en gran medida de la concentración del inhibidor presente en el experimento de digestión. Pueden usarse diversas diluciones en serie -como las aquí descritas- para obtener datos de una curva de calibración estándar, y dicha curva es útil para cuantificar los niveles del inhibidor o las potencias inhibitoras en una muestra experimental cuyo contenido de proteasa es desconocido. Una curva de calibración también puede ser útil en un ensayo para rastrear los inhibidores de proteasa potenciales.

EJEMPLO 9 – Análisis amperométrico de las reacciones de digestión

Se realizaron cuatro reacciones de digestión con un análisis amperométrico en tiempo real. Se resuspendieron enzimas liofilizadas para obtener una concentración de 10 mgml^{-1} . Se resuspendió tripsina en HCl (1 mM, pH 3.0); se resuspendieron papaína y carboxipeptidasa en NaCl (100 mM). Se usaron 75 µl de solución de Fc-BSA ($0,3\text{-}0,6 \text{ mgml}^{-1}$) por cada reacción. Cada reacción se realizó en un volumen total de 200 µl en los siguientes 'buffers' (se muestran las concentraciones finales): 100 mM de tris HCl, pH 7.8, en la reacción con tripsina; 20 mM de EDTA en la reacción con papaína; y 25 mM de tris HCl (pH 7.5) y 500 mM de NaCl en la reacción con carboxipeptidasa. Se añadieron 2 µl de enzimas (10 mgml^{-1}) a la mezcla de reacción de 200 µl. Los productos de reacción se analizaron mediante amperometría en un equipo como el que se ha descrito previamente y que se muestra en la Figura 1. Las condiciones amperométricas fueron como las que se establecen en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Parámetros de la amperometría

Parámetro	
<i>Pretratamiento</i>	
Potencial del primer acondicionamiento (V)	0
Duración (s)	0
Tiempo de estabilización (s)	4
<i>Medición</i>	
Tiempo de intervalo (>0,1 s)	0,4
Potencial (V)	*
Duración (s)	1200

*El potencial aplicado al electrodo de trabajo dependía del marcador de ferrocenilo y el pH del 'buffer'. Los potenciales del electrodo de trabajo en el caso de las diversas combinaciones de sustratos (de enzimas/ferrocenilados) se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3. Potenciales de electrodo usados para la detección amperométrica de los marcadores de ferrocenilo

Enzima	Marcador de ferrocenilo	Potencial de electrodo*
Tripsina	Fc	0,44
Tripsina	FcU	0,13
Papaína	FcU	0,13

Los resultados de los experimentos amperométricos se muestran en las Figuras 17 y 18.

En la Figura 17, se muestra la traza o huella amperométrica -en intervalos de tiempo- de la digestión de Fc-BSA con tripsina. La Línea A muestra la respuesta de la corriente no farádica a la aplicación del potencial al electrodo de trabajo antes de la adición de enzimas. A medida que el movimiento de los elementos presentes en la solución alcanza un estado constante, parece que la respuesta de la corriente empieza a disminuir. La Línea B muestra la respuesta de la corriente farádica a lo largo del tiempo tras la adición de enzimas, que tiene lugar una vez que la respuesta de la corriente no farádica alcanza un equilibrio. El aumento de la corriente que se muestra en la Línea B parece estar relacionado con la digestión enzimática del sustrato marcado con ferroceno.

En la Figura 18, se muestra la traza amperométrica -a lo largo del tiempo- de la digestión de FcU-BSA con papaína. La Línea A muestra la respuesta de la corriente no farádica a la aplicación del potencial al electrodo de trabajo antes de la adición de enzimas. A medida que el movimiento de los elementos presentes en la solución alcanza un estado constante, parece que la respuesta de la corriente empieza a disminuir. La Línea B muestra la respuesta de la corriente farádica a lo largo del tiempo tras la adición de enzimas, que tiene lugar una vez que la respuesta de la corriente no farádica alcanza un equilibrio. El aumento de la corriente que se muestra en la Línea B parece estar relacionado con la digestión enzimática del sustrato marcado con ferroceno. La traza amperométrica -a lo largo del tiempo- de la digestión de FcU-BSA con tripsina no se ilustra en los dibujos, pero fue análoga.

Tal y como se observa en las Figuras 17 y 18, el marcador electroquímicamente activo permite seguir en tiempo real una reacción de proteasas a medida que la reacción avanza, sin que sea necesario retirar las alícuotas. Es posible obtener una gran cantidad de información cinética a partir de gráficos como los de las Figuras 17 y 18, lo que brinda la posibilidad de estudiar la cinética de las enzimas.

EJEMPLO 10 – Ensayo de aminopeptidasa

Se obtuvo aminopeptidasa en forma de 20 U ml^{-1} en una solución de sulfato de amonio. El sustrato de alanina ferrocenilado del Ejemplo 4b se disolvió en etanol a una concentración de 100 mM. Después, se diluyó aún más para obtener una solución de trabajo de 1 mM en 100 mM de tris HCl (pH 7.5). Para un volumen de 200 μl , se incubaron 195 μl de solución de sustrato (1 mM en tris HCl/ 1% v/v de etanol) y 5 μl (0,01U) de aminopeptidasa durante un máximo de 15 minutos a 37° C. La muestra se analizó mediante voltametría de pulso diferencial (VPD o DPV, por sus siglas en inglés) antes de la incubación, después de 5 minutos de incubación y después de 15 minutos de incubación. La DPV se realizó como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 19a y la Figura 19b. La Figura 19a muestra los datos sin procesar y la Figura 19b muestra los mismos datos con la línea de base corregida utilizando el GPES Manager tal y como se ha explicado en el Ejemplo 5. La línea A muestra la traza voltamétrica de la alanina ferrocenilada, antes de la incubación con aminopeptidasa; la línea B muestra la traza voltamétrica después de 5 minutos de incubación con aminopeptidasa; y la línea C muestra la traza voltamétrica después de 15 minutos de incubación con aminopeptidasa. Puede apreciarse que la digestión del sustrato provoca que el potencial de corriente máximo cambie. Tras 15 minutos de digestión, el cambio es de aproximadamente 80 mV.

EJEMPLO 11 – Ensayo de elastasa

La elastasa se obtuvo, liofilizó y rehidrató en un 'buffer' de 100 mM de tris HCl (pH 8.5) a 10 mg/ml. Se preparó una alícuota de 200 μl de muestra de prueba para contener 50 μl de sustrato de tripéptido marcado con ferroceno (el péptido de trialanina ferrocenilado se preparó como en el Ejemplo 4c), 1 μl de elastasa en tris HCl, y se completó el volumen hasta 200 μl añadiendo más 'buffer' de tris HCl. La solución se incubó durante 1 hora a 37° C. La muestra se analizó mediante voltametría de pulso diferencial (DPV) antes de la incubación y después de 1 hora de incubación. La DPV se realizó como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 20a y la Figura 20b. La Figura 20a muestra los datos sin procesar y la Figura 20b muestra los mismos datos con la línea de base corregida utilizando el GPES Manager tal y como se ha explicado en el Ejemplo 5. La línea A muestra la traza voltamétrica del sustrato, antes de la incubación con elastasa; la línea B muestra la traza voltamétrica después de 1 hora de incubación con elastasa. Puede apreciarse que la digestión del sustrato provoca que el potencial de corriente máximo cambie. Sin embargo, el cambio es menor que el que se señala en el Ejemplo 10.

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para detectar la actividad proteasa (o actividad de las proteasas) en una solución de muestra, de manera que el método incluye poner en contacto la solución de muestra con un sustrato de proteasa marcado con un marcador electroquímicamente activo, proporcionar las condiciones adecuadas para que cualquier proteasa que pueda estar presente en la muestra pueda degradar el sustrato de proteasa, y determinar electroquímicamente la información relacionada con el marcador electroquímicamente activo, que se caracteriza por el hecho de que el marcador electroquímicamente activo es una fracción de metaloceno y el sustrato de proteasa es un péptido de al menos 5 residuos de aminoácidos.
- 10 2. Un método como el que se reivindica en la reivindicación 1, en el que la información relacionada con el marcador electroquímicamente activo se obtiene mediante voltametría.
- 15 3. Un método como el que se reivindica en la reivindicación 2, en el que la información relacionada con el marcador electroquímicamente activo se obtiene mediante voltametría de pulso diferencial.
- 20 4. Un método como el que se reivindica en la reivindicación 1, en el que la información relacionada con el marcador electroquímicamente activo se obtiene mediante técnicas amperométricas.
- 25 5. Un método como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la información relacionada con el marcador electroquímicamente activo se obtiene mediante una técnica que utiliza uno o más electrodos que están rodeados funcionalmente por una membrana selectivamente permeable.
6. Un método como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el marcador electroquímicamente activo es una fracción de ferroceno.
- 30 7. Un método como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el marcador electroquímicamente activo está unido al sustrato mediante un enlazador.
- 35 8. Un método como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que cada molécula del sustrato se marca, de media, con más de una molécula del marcador electroquímicamente activo.
9. Un método como el que se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para detectar una enfermedad en un sujeto.
- 40 10. Un método como el que se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para detectar un patógeno.
- 45 11. Un método como el que se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para rastrear un inhibidor de proteasas.
- 50
- 55
- 60
- 65

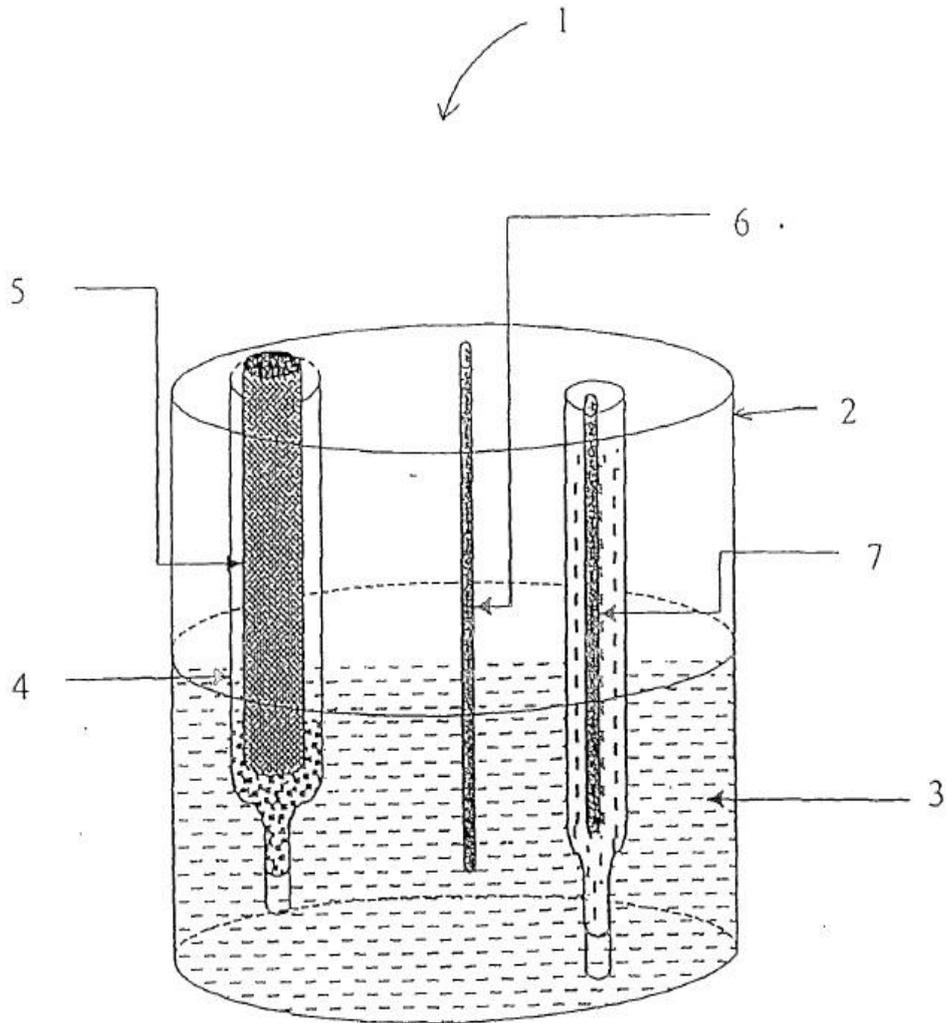


Figura 1

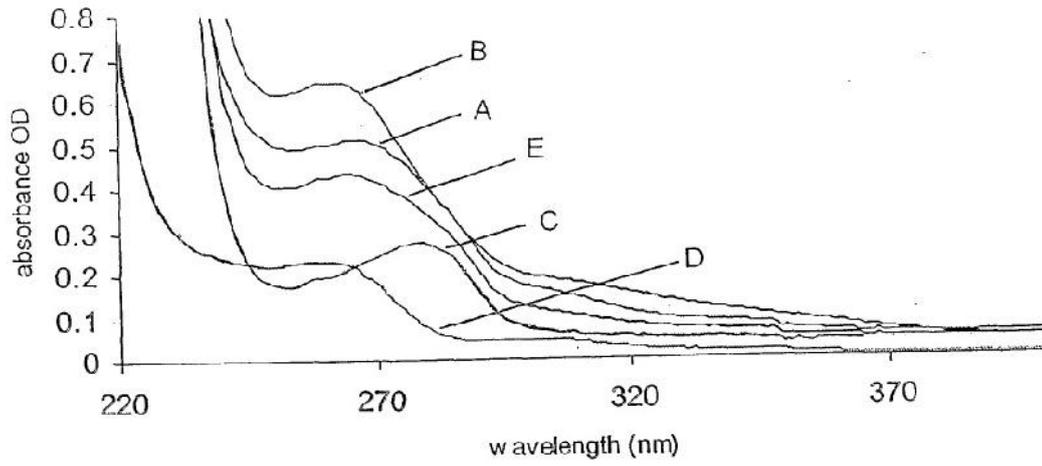


Figura 2

- A = muestra de Fc:BSA
- B = BSA:FCA 20:1
- C = BSA
- D = FCA
- E = BDSA:FCA 10:1

-Absorbance (OD): absorbancia (DO)
-Wavelength (nm): longitud de onda (nm)

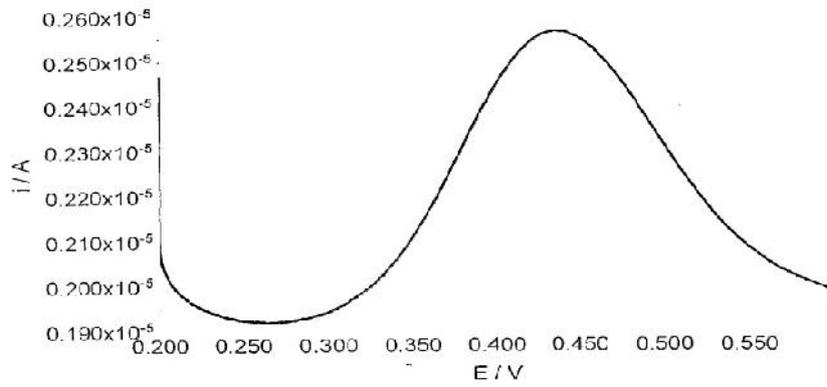


Figura 3(a)

i (I) = corriente o intensidad eléctrica
 A = amperio(s)
 E = potencial de electrodo
 V = voltio(s)

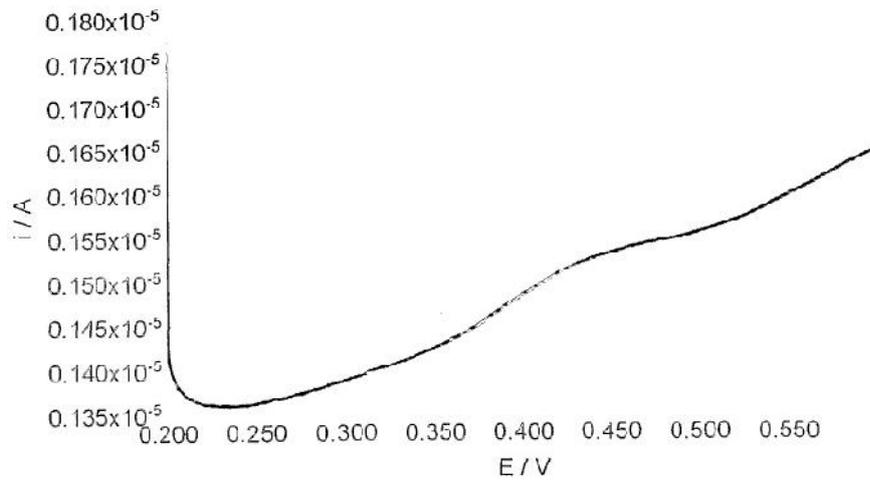


Figura 3(b)

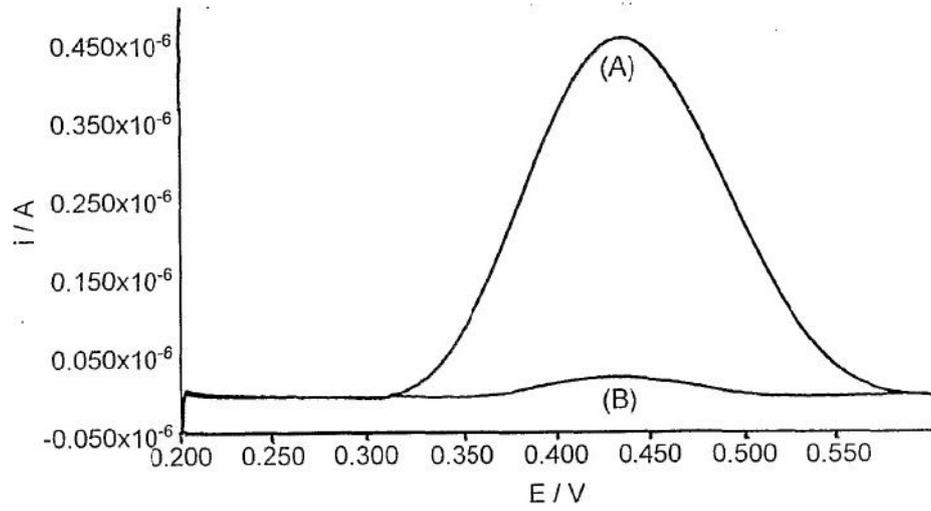


Figura 3(c)

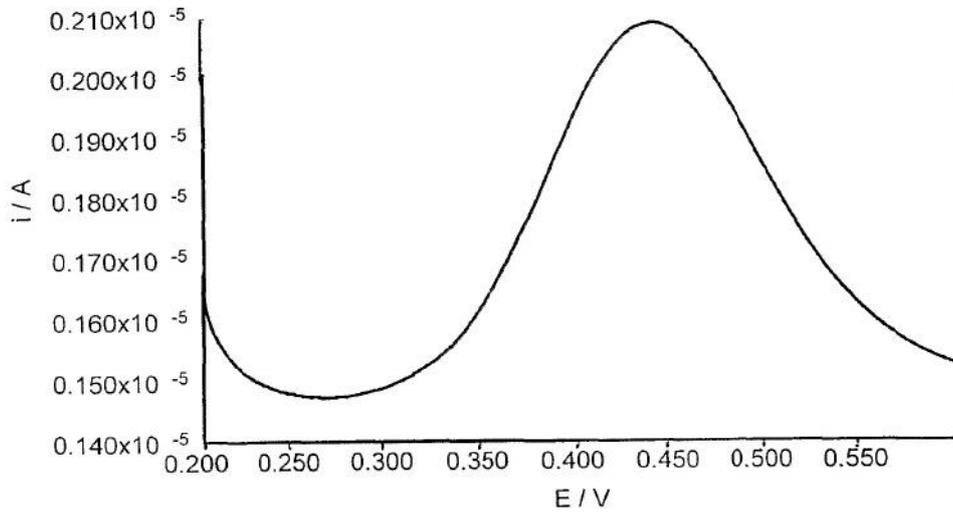


Figura 4(a)

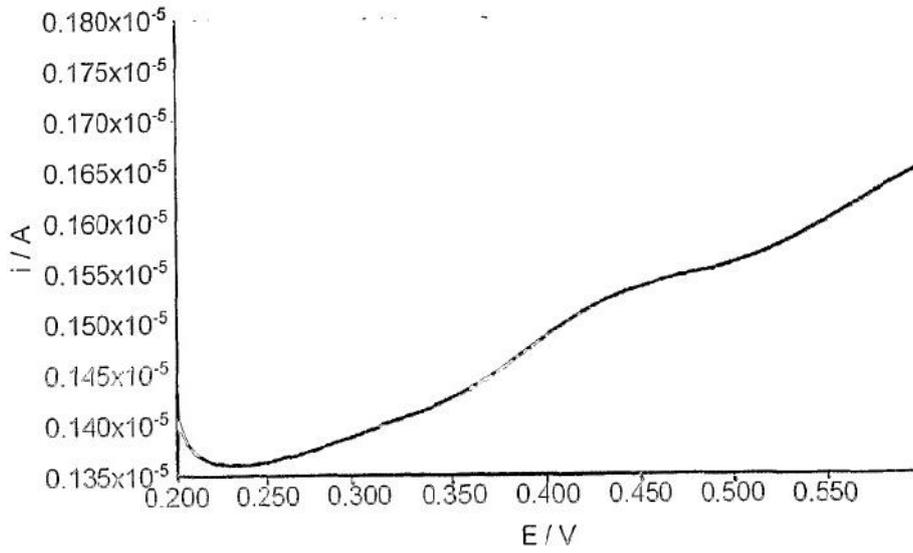


Figura 4(b)

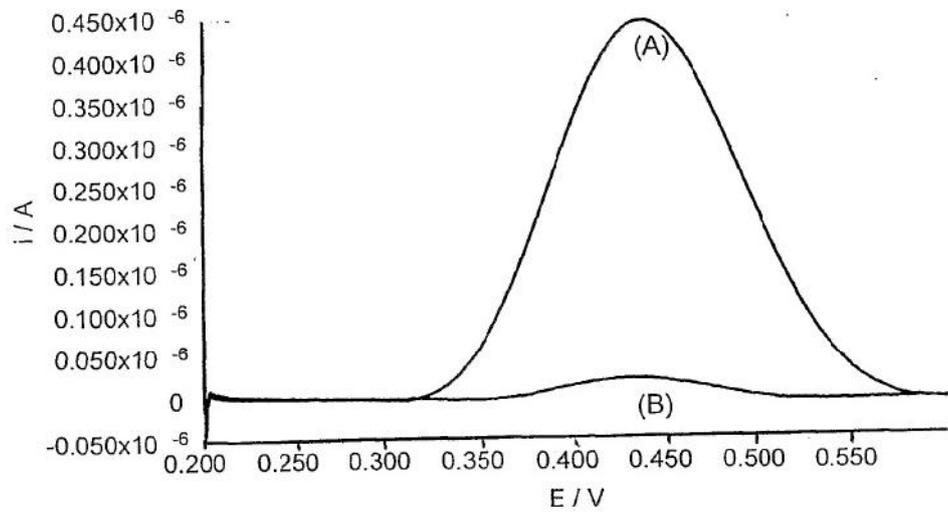


Figura 4(c)

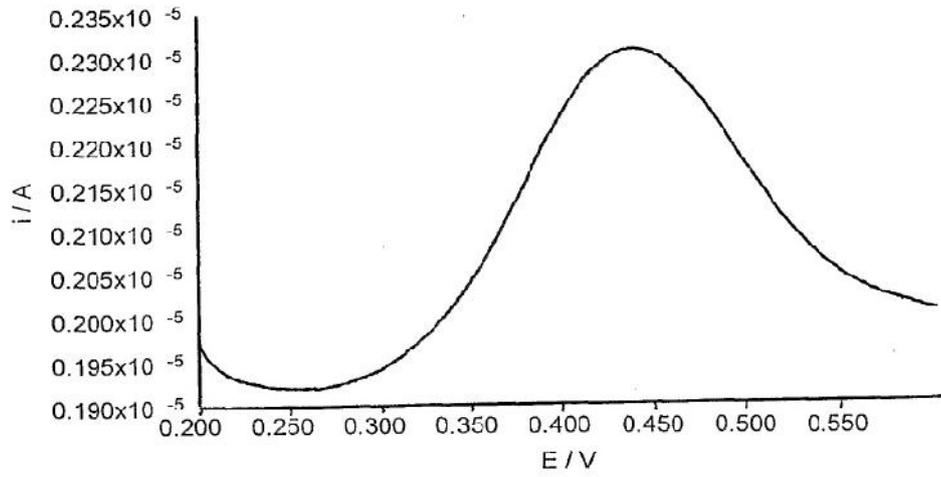


Figura 5(a)

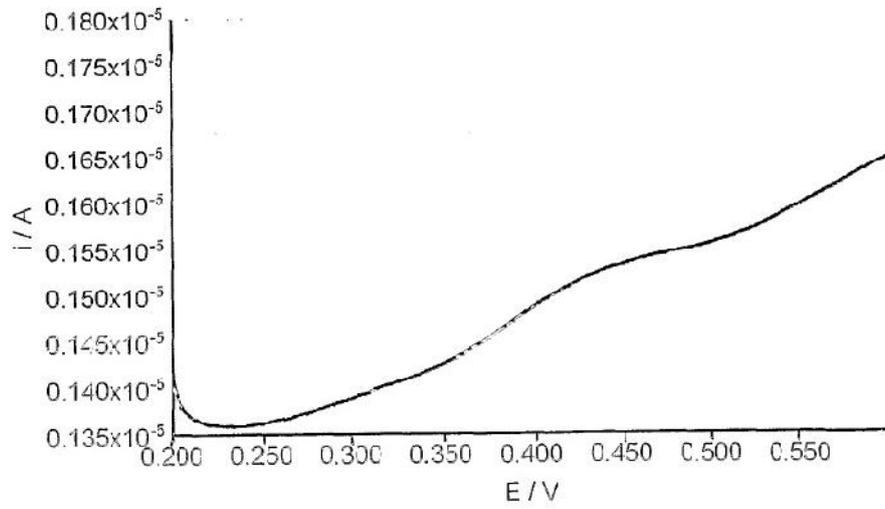


Figura 5(b)

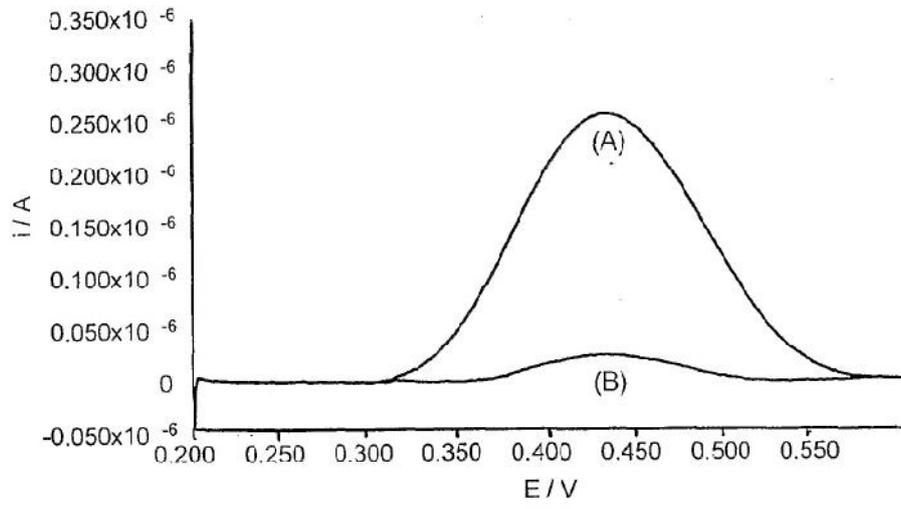


Figura 5(c)

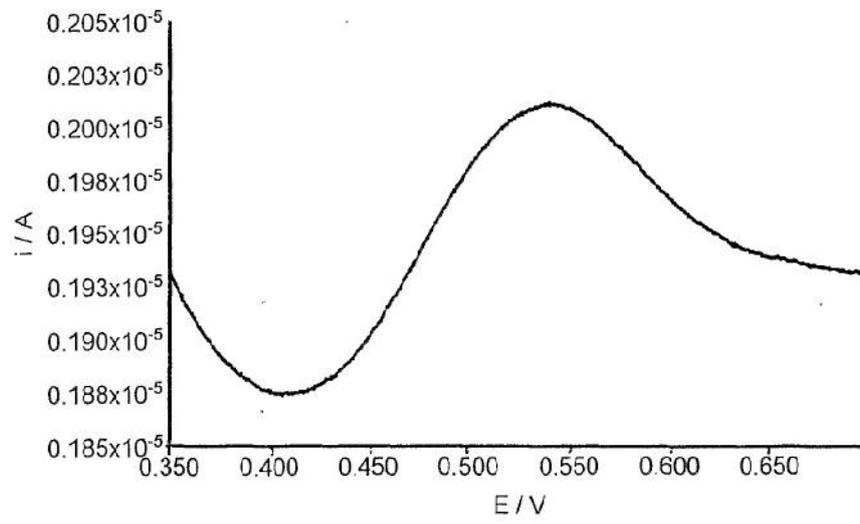


Figura 6(a)

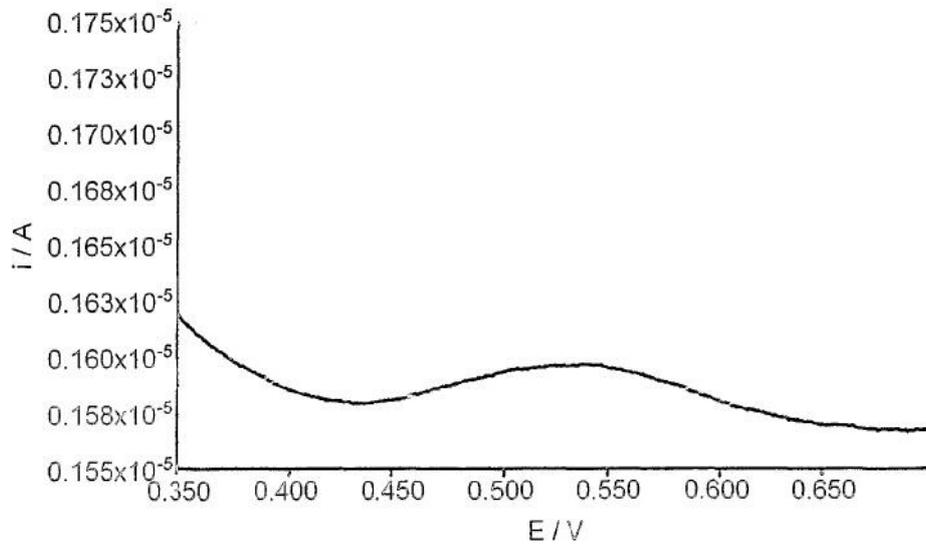


Figura 6(b)

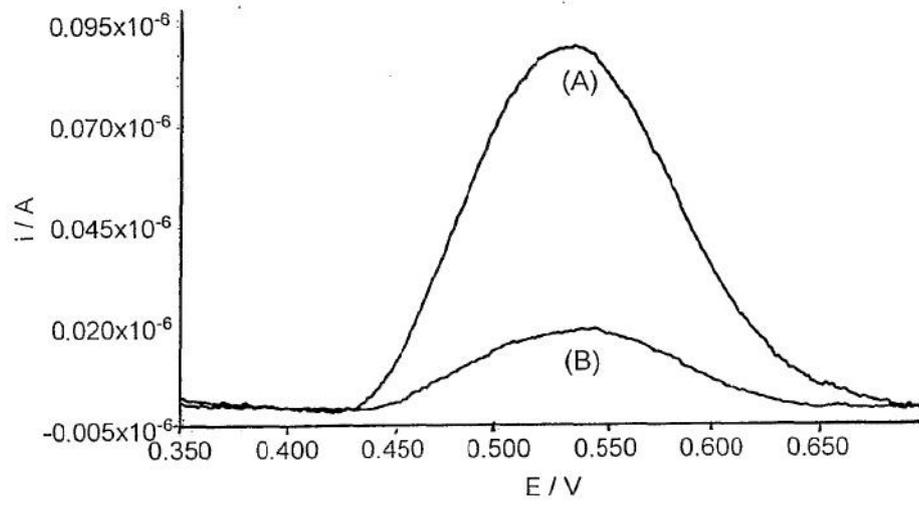


Figura 6(c)

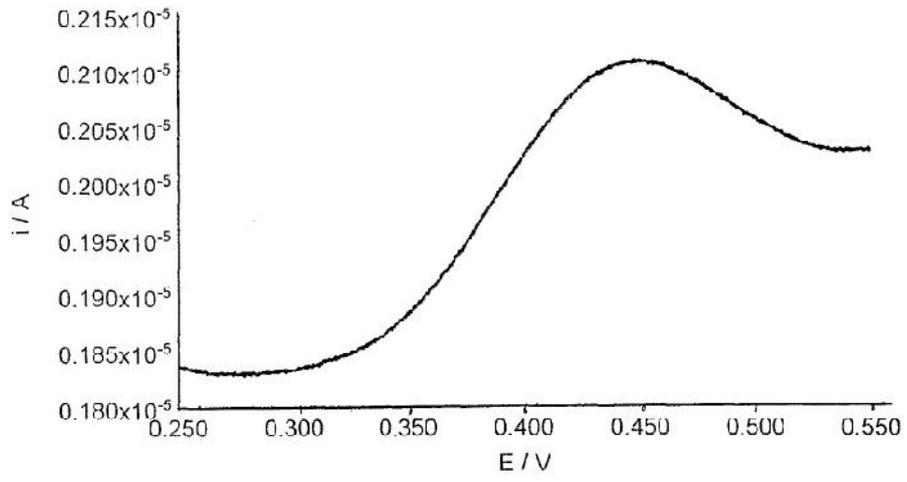


Figura 7(a)

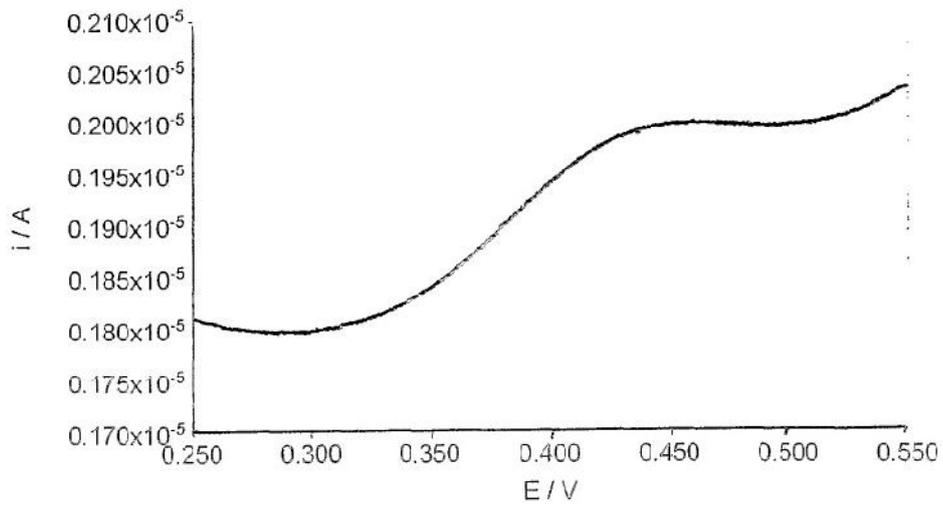


Figura 7(b)

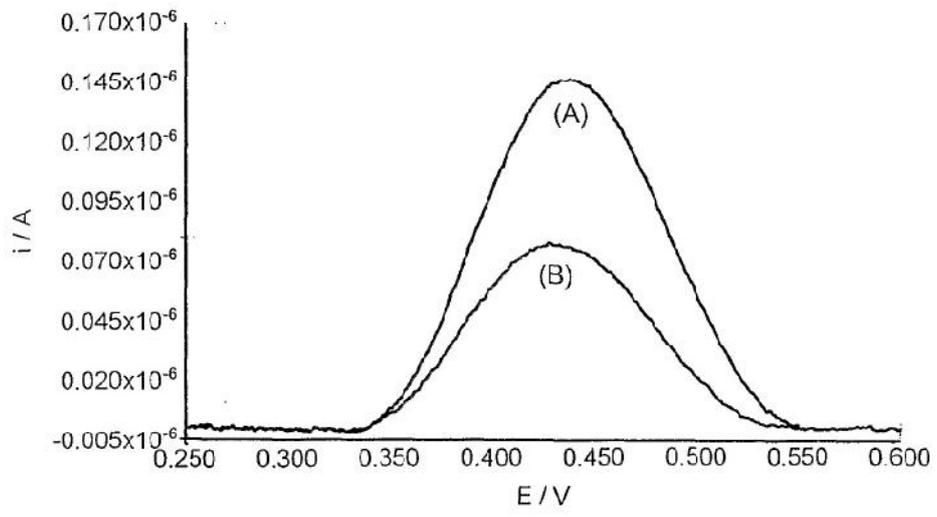


Figura 7(c)

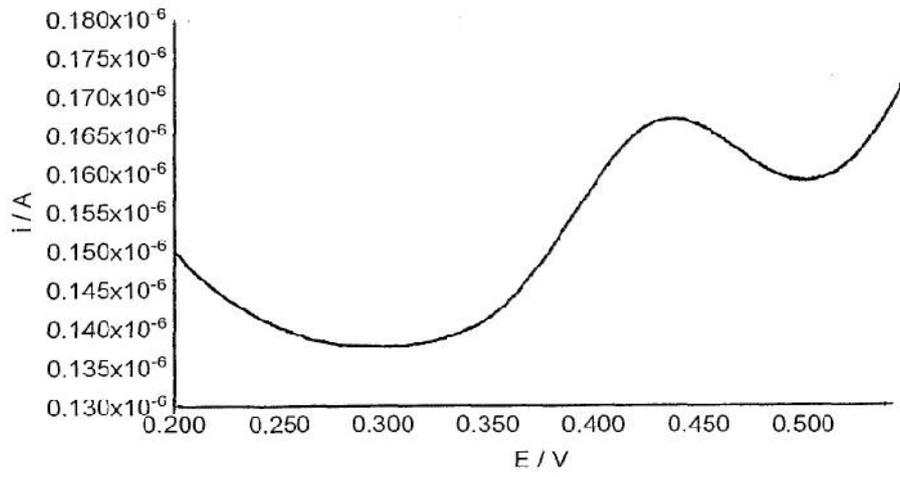


Figura 8(a)

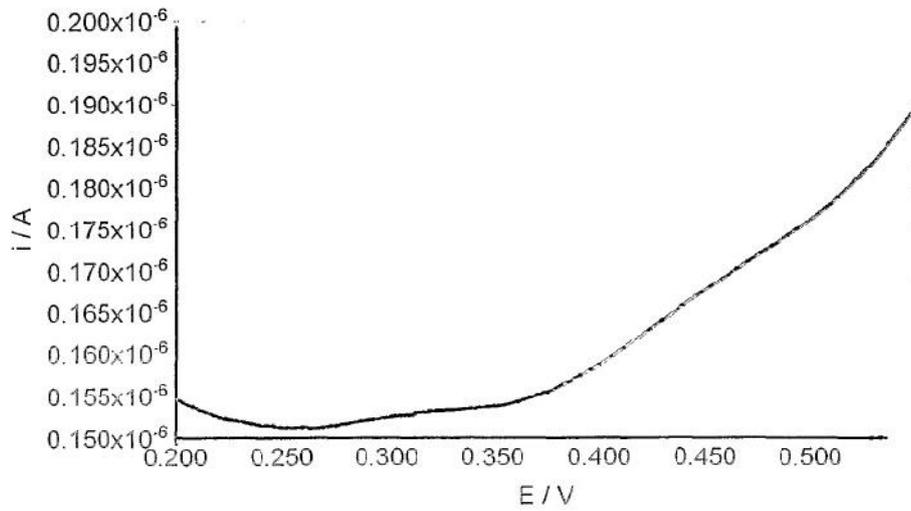


Figura 8(b)

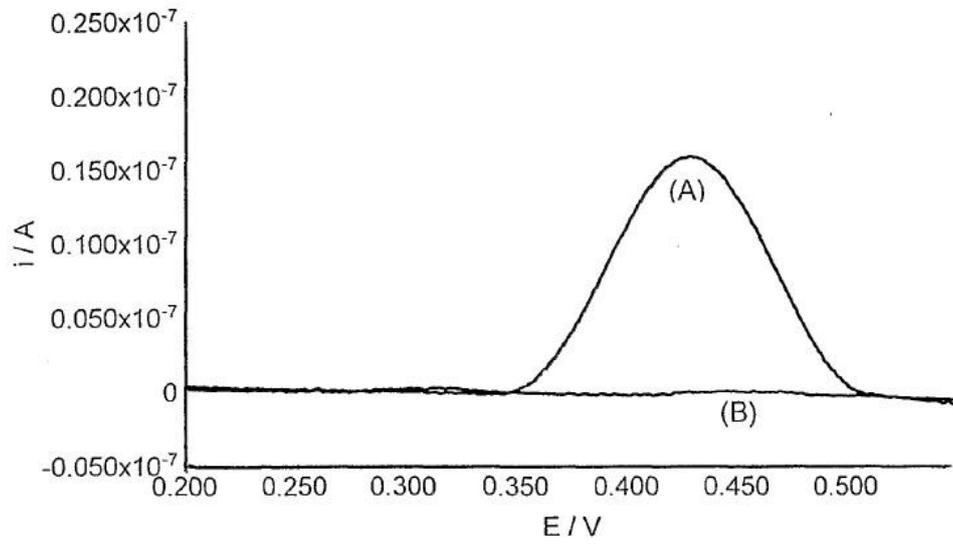


Figura 8(c)

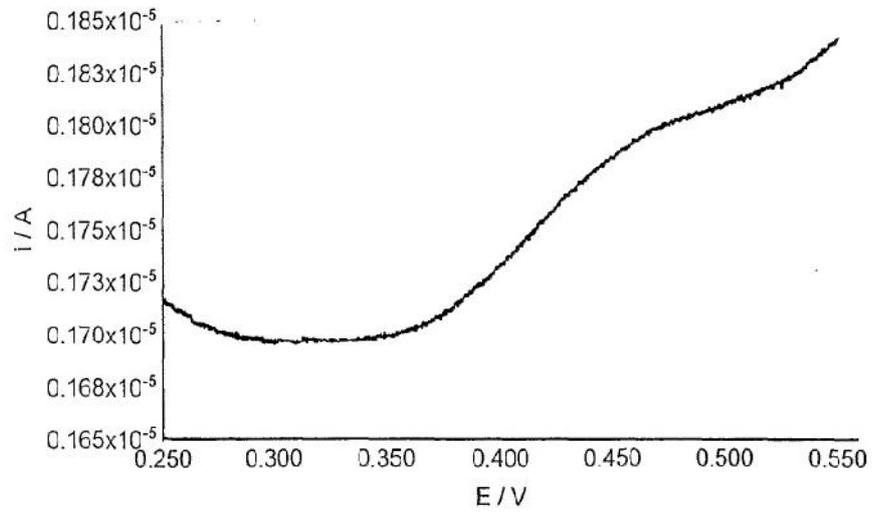


Figura 9(a)

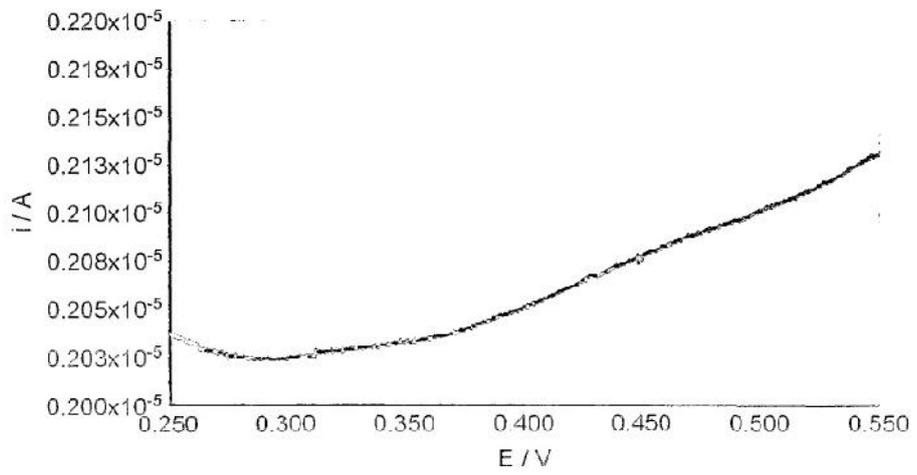


Figura 9(b)

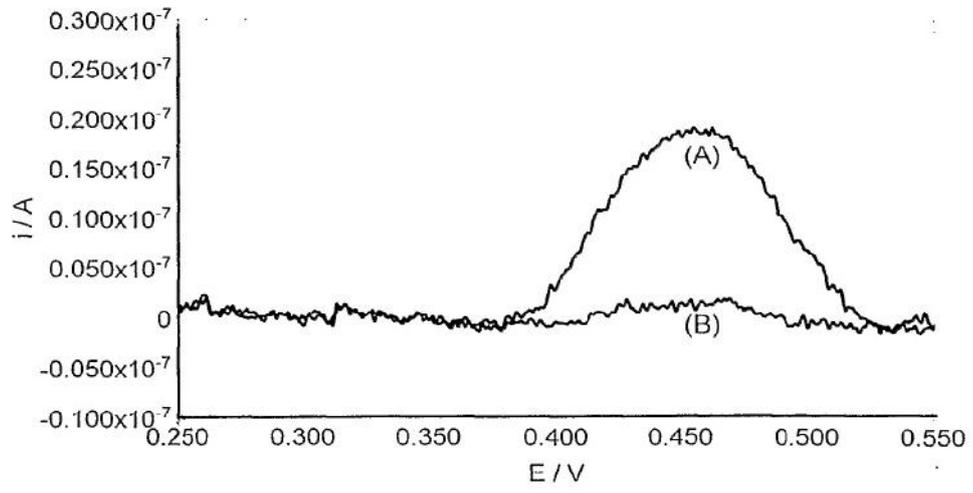


Figura 9(c)

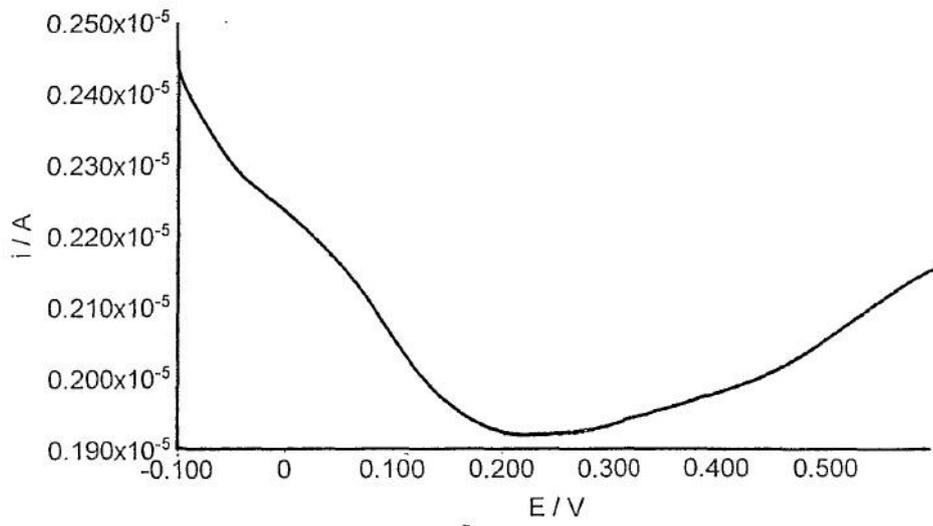


Figura 10(a)

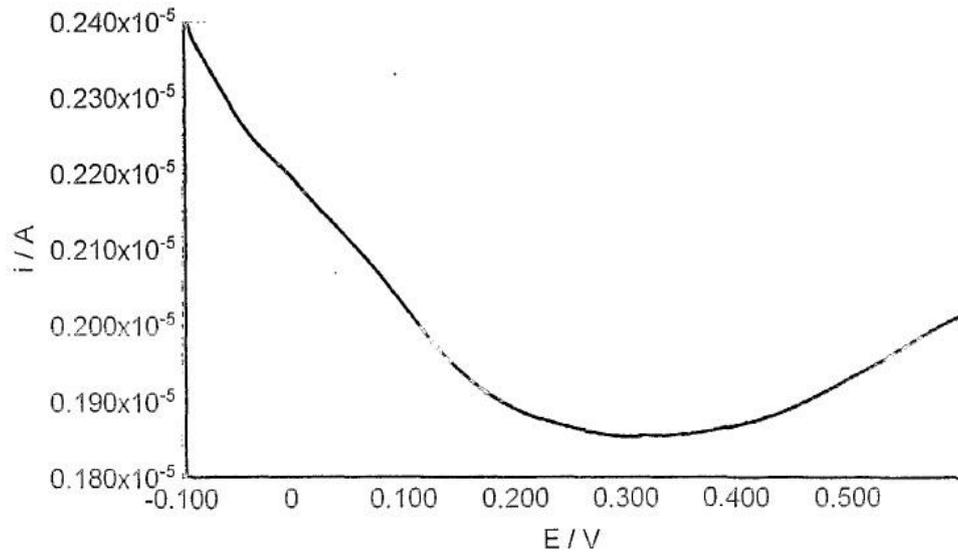


Figura 10(b)

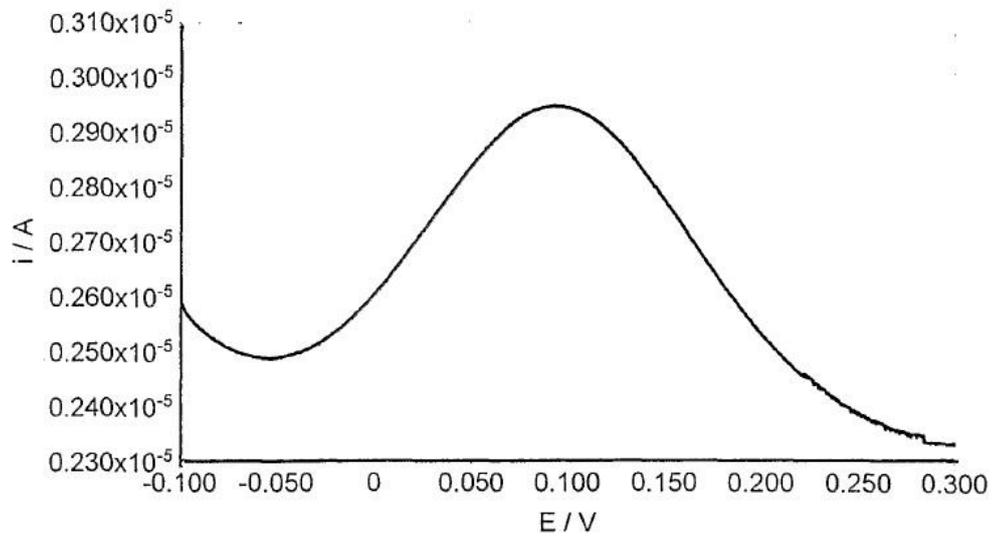


Figura 11(a)

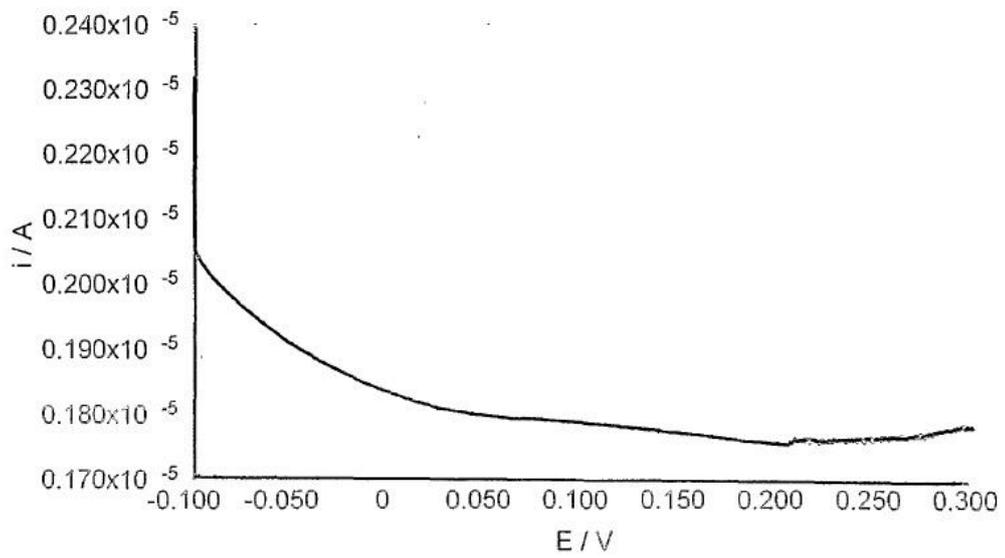


Figura 11(b)

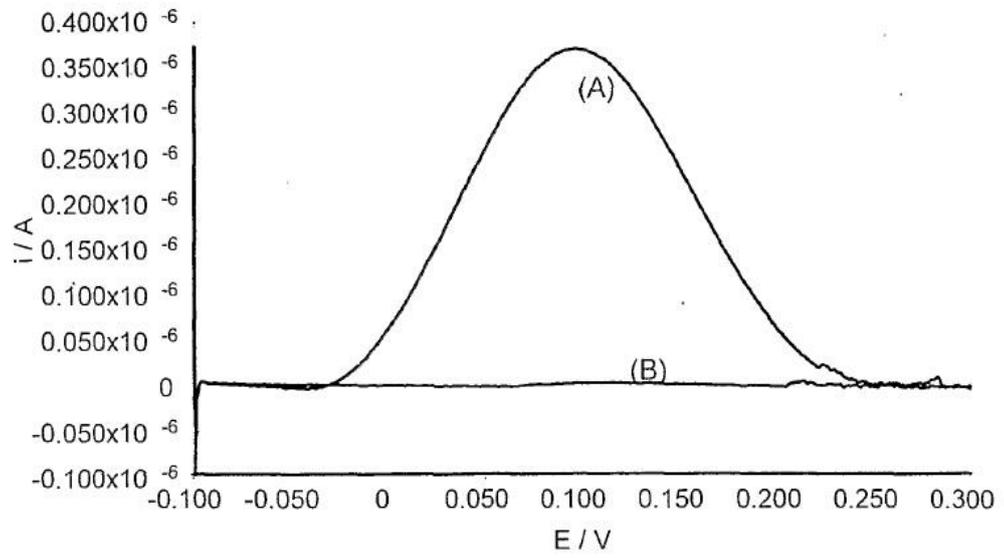


Figura 11(c)

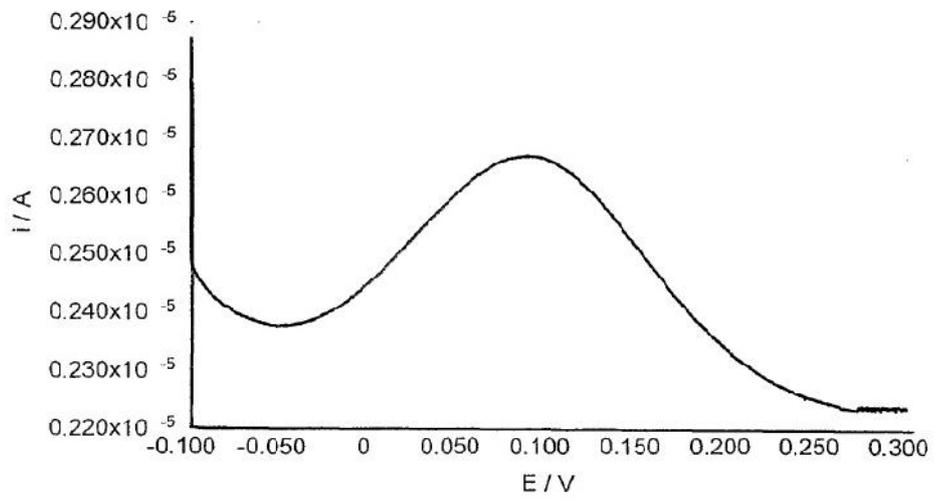


Figura 12(a)

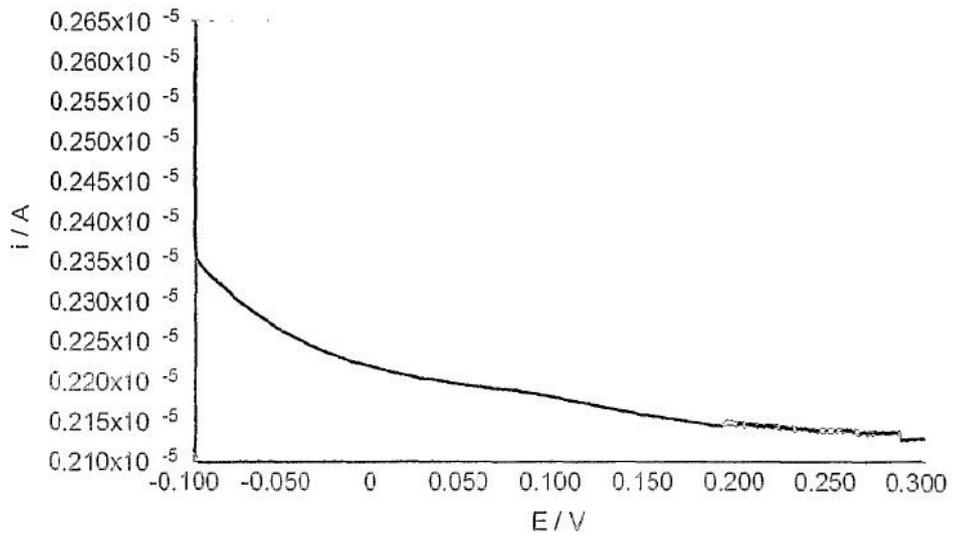


Figura 12(b)

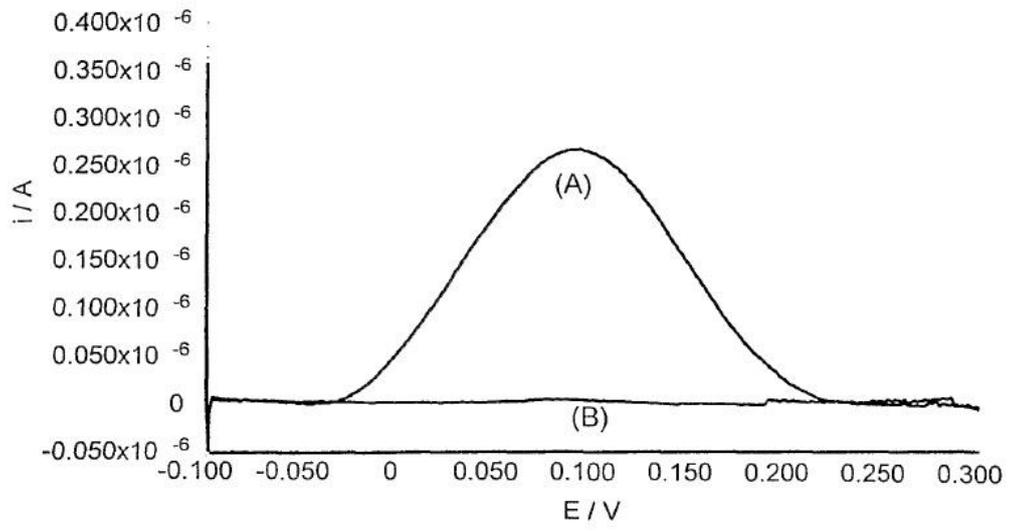


Figura 12(c)

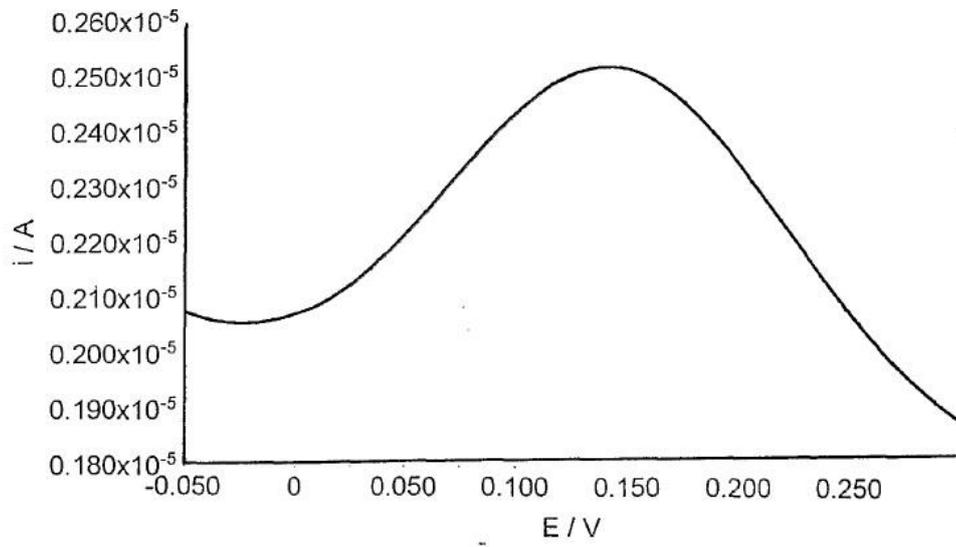


Figura 13(a)

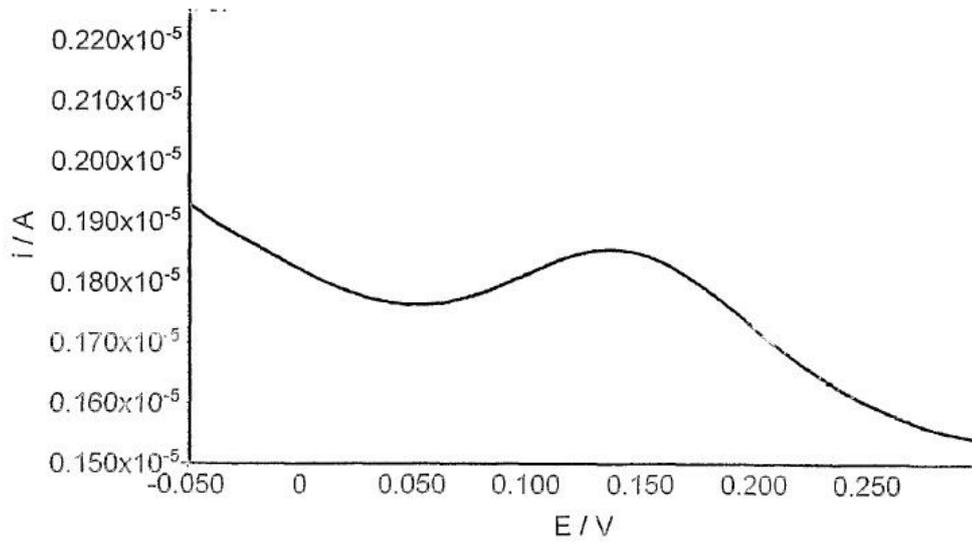


Figura 13(b)

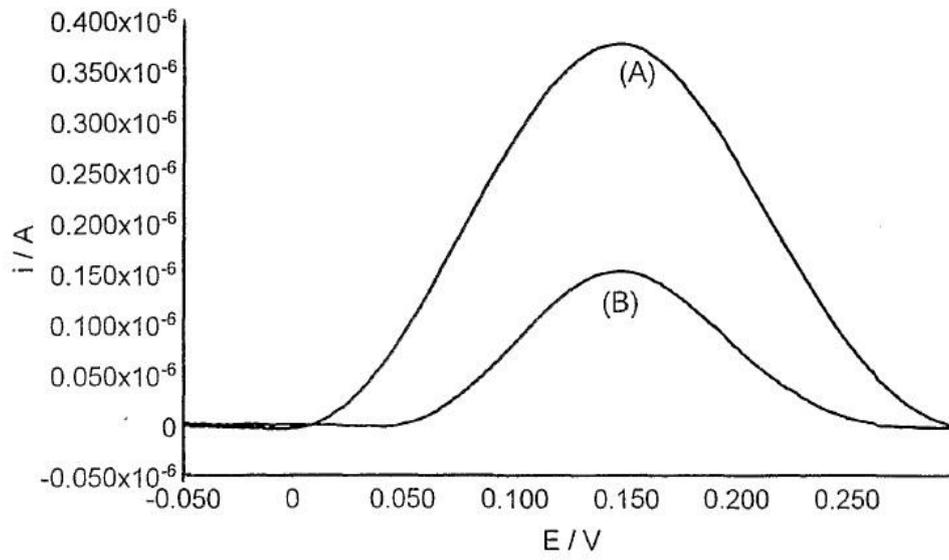


Figura 13(c)

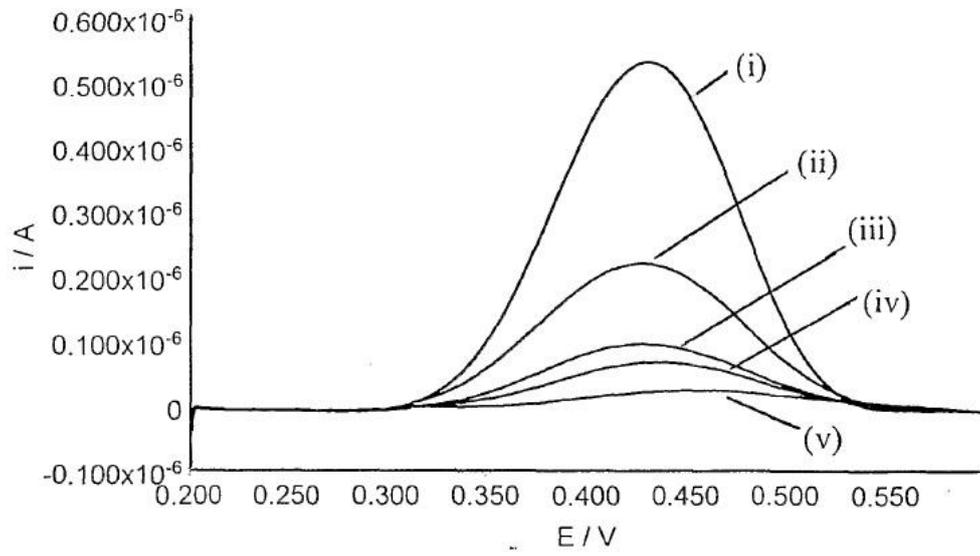


Figura 14

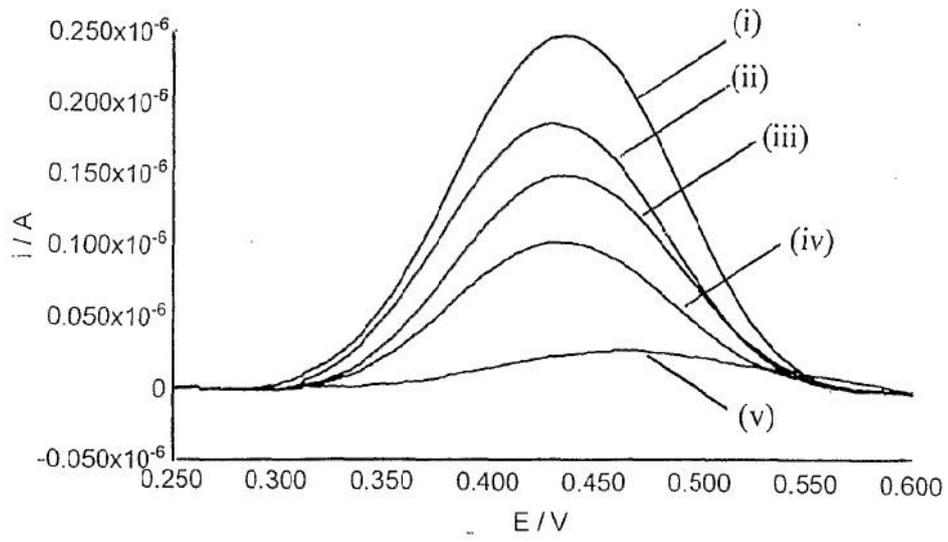


Figura 15

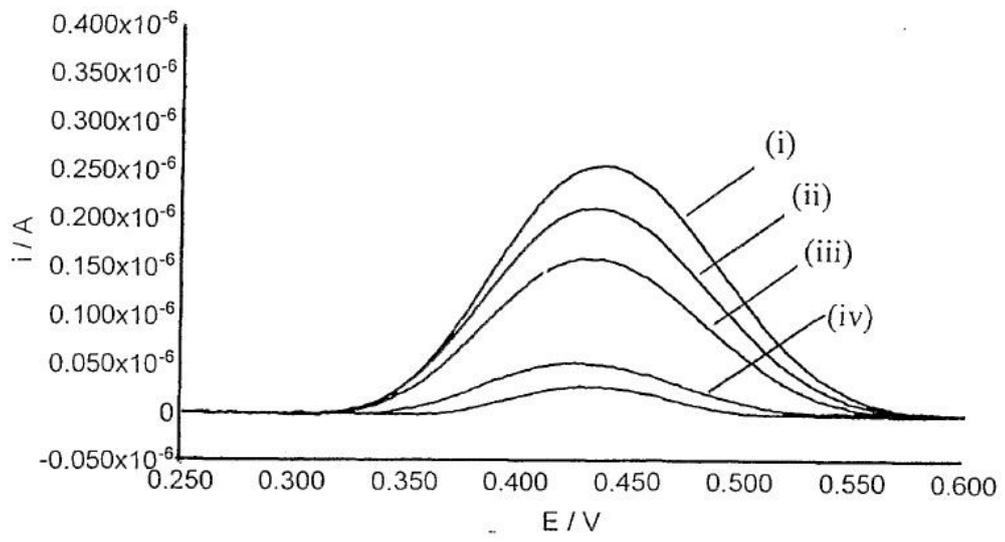


Figura 16

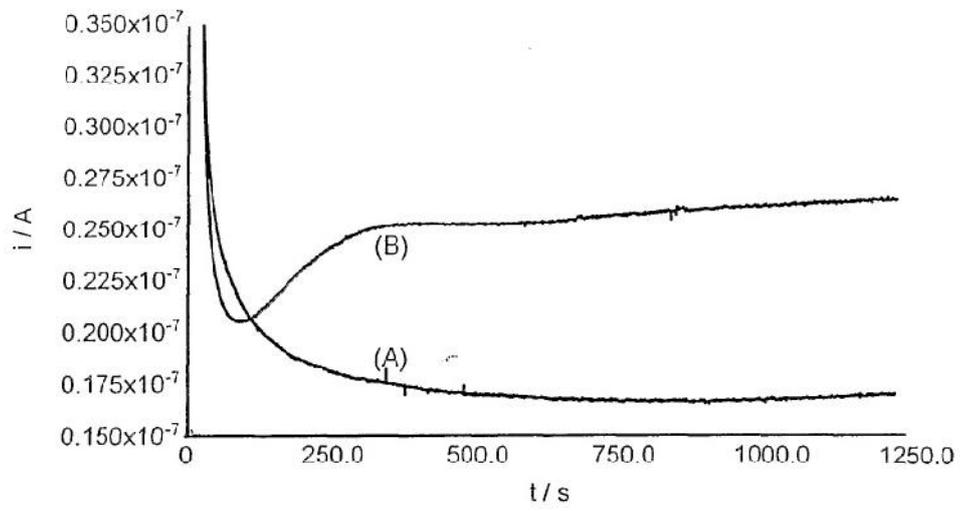


Figura 17

i (I) = corriente o intensidad eléctrica
 A = amperio(s)
 t = tiempo
 s = segundo(s)

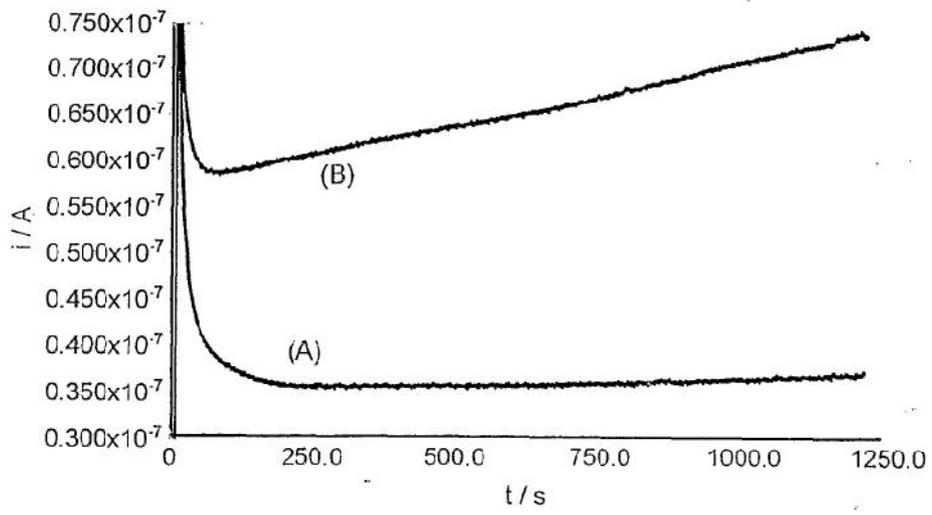


Figura 18

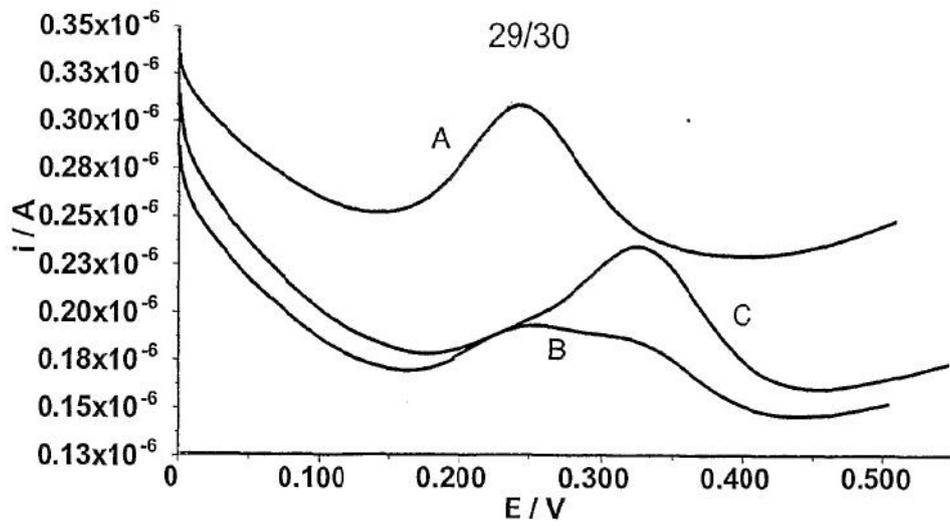


Figura 19(a)

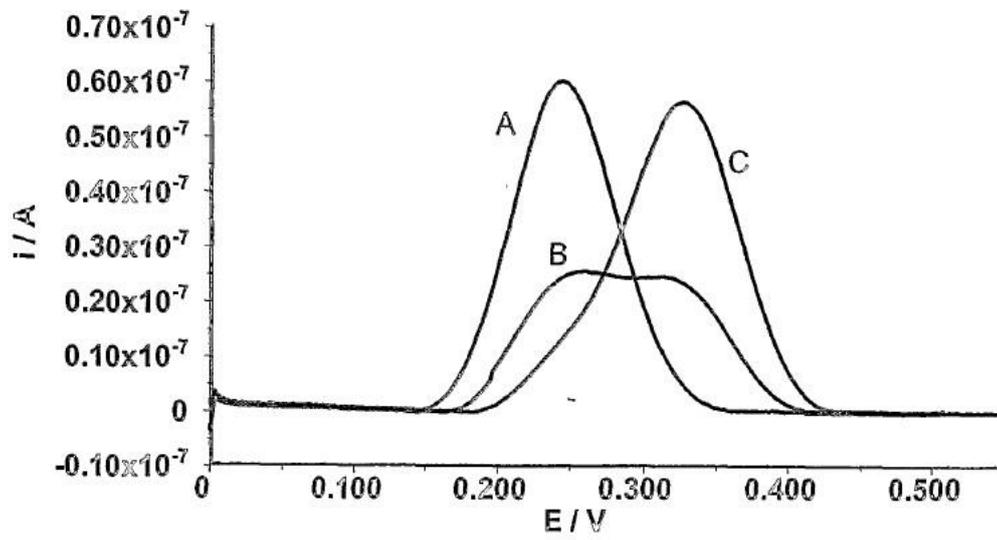


Figura 19(b)

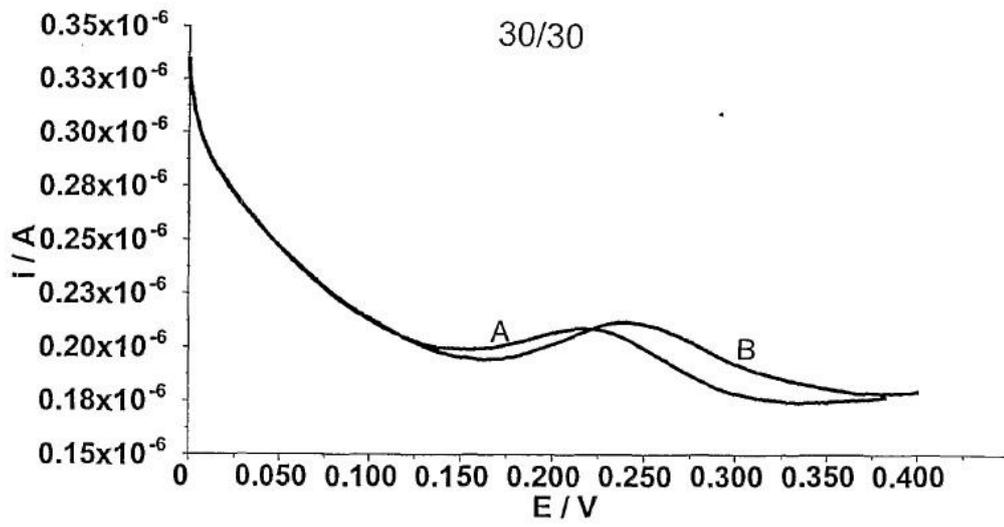


Figura 20(a)

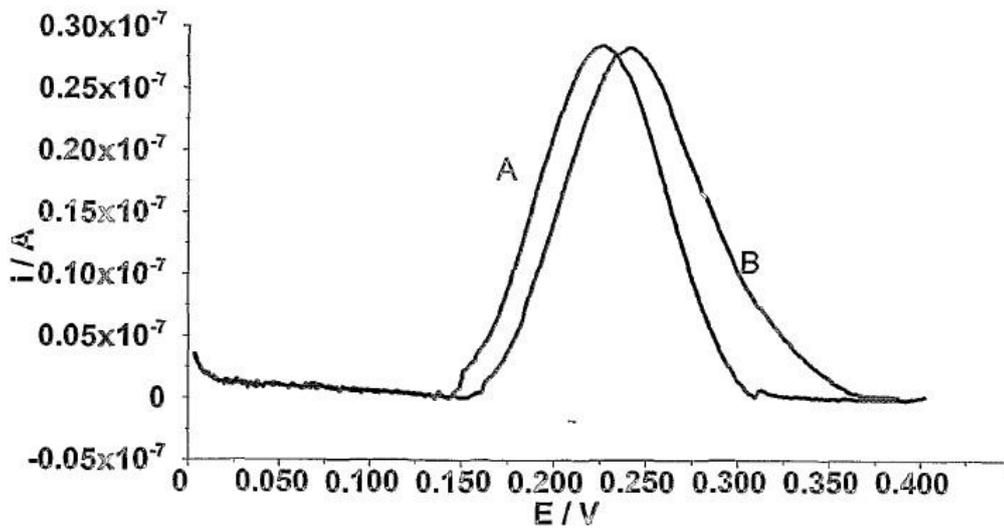


Figura 20(b)