



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00869**

(22) Data de depozit: **26/11/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2017** BOPI nr. 11/2017

(41) Data publicării cererii:
30/05/2014 BOPI nr. 5/2014

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
ȘI DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ
"HORIA HULUBEI", STR.REACTORULUI
NR.30, MĂGURELE, IF, RO**

(72) Inventatori:
• **DOROBANȚU IOAN,
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.1, BL.OD 2,
SC.C, AP.110, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **NEAGU LIVIA,
STR.ALEXANDRU LĂPUȘNEANU NR.81,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**RO 125536 B1; P. K. NAKANE, A. KAWAOI,
"PEROXIDASE-LABELED ANTIBODY
A NEW METHOD OF CONJUGATION",
THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY
AND CYTOCHEMISTRY, NR. 12, VOL. 22,
PP. 1084-1091, 1974; L. P. BUDNIKOVA,
A. N. ERYOMIN, "SYNTHESIS AND
PROPERTIES OF HORSERADISH
PEROXIDASE COPOLYMERS",
APPLIED BIOCHEMISTRY AND
MICROBIOLOGY, NR. 2, VOL. 42,
PP. 127-133, 2006**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A MARKERULUI ENZIMATIC
ACID 2,4-DICLOROFENOXIACETIC-
-HEXAMETILENDIAMIN-PEROXIDAZĂ**



Invenția se referă la un procedeu de obținere a markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază utilizat în tehnica imunochimică în fază omogenă, pentru dozarea pesticidului acid 2,4-diclorofenoxiacetic din probe biologice și de mediu.

În prezent, sunt cunoscuți markeri enzimatici realizați prin cuplarea directă a pesticidului cu enzimă prin activarea acestuia cu carbodiimida, utilizând enzime ca fosfataza alcalină cu masa moleculară mare sau prin intermediul unei punți de legătură între enzimă și pesticid, iar aceștia pot fi utilizați în tehnica ELISA (tehnica imunochimică de analiză care folosește markeri enzimatici cuplați la imunosorbent-faza solidă, care au la suprafață componente imune, anticorpi sau antigene) heterogenă, cuplajul componentului imun, anticorplu la suprafață de plastic a godeurilor plăcii ELISA, și nu pot fi utilizați în faza omogenă (cazul în care cele două componente, anticorplu și antigenul fiind în soluție, iar separarea complexului imun de markerul enzimatic nereacționat este dificilă din cauza masei moleculare mari a acestuia). Un alt dezavantaj este scăderea activității enzimatice a markerului în timpul sintezei.

Brevetul **RO 125536 B1** descrie un procedeu care cuprinde activarea grupării carboxil a pesticidului acid 3,6-dicloro-2-metoxibenzoic prin reacția acestuia cu N-hidroxisuccinimidă și 1-etil-3-(3'-diaminopropil)-carbodiimidă în 2 ml dimetilformamidă, cuplarea pesticidului activat de hexametilendiamină în tampon carbonat de sodiu 50 mM la pH 9,6, urmată de purificarea derivatului obținut prin cromatografie pe coloană, iar apoi de cuplare la fosfatază alcalină.

În lucrarea științifică **"Peroxidase-Labeled Antibody A New Method of Conjugation"**, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1974, Vol. 22, Nr. 12, pp.1084-1091, avându-i ca autori pe P. K. Nakane și A. Kawaoi, se prezintă o metodă de conjugare a peroxidazei din hrean cu proteine. Metoda presupune blocarea grupărilor α - și ε -amino și a grupărilor hidroxil, rămase libere în molecula peroxidazei, cu 2,4-dinitrofluorbenzen (FDNB) în prezență de bicarbonat de sodiu și etanol, urmată de dializă și de oxidarea peroxidazei cu NaIO_4 , cu formarea aldehyd-peroxidazei, care ulterior poate fi cuplată la un anticorp, iar conjugatul obținut poate fi stabilizat cu NaBH_4 . Metoda descrisă este complexă, consumatoare de timp, iar produșii de oxidare pot afecta pe termen lung activitatea enzimei.

Lucrarea științifică **"Synthesis and Properties of Horseradish Peroxidase Copolymers"**, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, Vol. 42, Nr. 2, pp. 127-133, avându-i ca autori pe L.P. Budnikova și N. Eryomin, prezintă obținerea unui copolimer al peroxidazei native prin oxidarea peroxidazei cu periodat de sodiu, reacția peroxidazei oxidate cu hexametilendiamină și peroxidază, copolimerul obținut fiind ulterior redus cu borohidru de sodiu. Copolimerul peroxidază-hexametilendiamină nu este însă un indicator pentru utilizare ca marker pesticid-diamină-peroxidază în tehnica ELISA.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a obține marker enzimatic care să poată fi utilizat în tehnica imunochimică pentru dozarea acidului 2,4-diclorofenoxiacetic din probe biologice și de mediu.

Procedeu de obținere a markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilen-peroxidază conform invenției se caracterizează prin aceea că:

- se dizolvă 25 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 100 mg 1-etil-3-(3'-diaminopropil)carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă la temperatura camerei, timp de 3 h, rezultând un amestec de pesticid activat, care se introduce peste o soluție de hexametilendiamină 8 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 și se lasă ca acestea să reacționeze timp de 3 h, obținându-se un derivat acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilen-diamină,

- se oxidează 5 mg de peroxidază cu 0,5 ml NaIO_4 30mg/ml timp de 30 min, iar apoi se purifică prin cromatografie pe coloană Sephadex G25 pentru îndepărtarea agentului oxidant, rezultând un eluat enzimatic care conține 4,5 ml enzimă,	1
- amestecul format de eluatul enzimatic, conținând 4,5 mg enzimă, se supune, timp de 3 h, reacției cu 200 μl soluție de derivat 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamină, produsul 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază fiind apoi purificat prin cromatografie pe Sephadex G25, redus cu 200 μl NaBH_4 5 mg/ml și purificat din nou pe Sephadex G25, soluția de marker enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacet-hexametilendiamin-peroxidază fiind, în final, amestecată cu glicerol în proporție volumică 1:1 (v/v) și depozitată la -20°C , în vederea utilizării în tehnica imunochimică.	3
Procedeul conform invenției prezintă atât avantajul că produsul marker enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacet-hexametilendiamin-peroxidază prezintă o activitate enzimatică specifică ridicată, cât și avantajul că acest produs se obține într-un timp mult mai scurt, de aproximativ 3...5 h, față de procedeele descrise pentru alți conjugați peroxidază-proteine din stadiul tehnicii.	5
Procedeul conform invenției constă în aceea că 25 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 100 mg 1-etil-3-(-3'-diaminopropil)-carbodiimidă se dizolvă în 1 ml dimetilformamidă și se agită 3 h în vederea activării grupării carboxi a pesticidului. Amestecul de pesticid activat se introduce peste 8 mg hexametildiamină în 1 ml tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 și lăsat să reacționeze 3 h pentru cuplarea diaminei la pesticid și obținerea derivatului acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamină, ce este utilizat la cuplarea cu enzima. 5 mg de enzimă peroxidază ce conține circa 20% carbohidrați în structură, dizolvată în 1 ml tampon fosfat 10 mM pH 7,2, a fost tratată cu 0,5 ml soluție de NaIO_4 (periodat de sodiu) 30 mg/ml în vederea oxidării carbohidratului existent pe suprafața enzimei, timp de 30 min, după care a fost purificată prin cromatografie pe Sephadex G25 în vederea separării de agentul oxidant. Eluatul enzimatic (4,5 mg enzimă) rezultat în operația de cromatografiere a fost amestecat cu 200 μl soluție de derivat 2,4-diclorofenoxiacet-hexametilendiamină, iar reacția de cuplare între enzimă și derivatul pesticidic s-a desfășurat timp de 3 h, urmat de purificare pe Sephadex G25.	7
Eluatul ce conține markerul enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamina-peroxidază (baza Schiff formată) rezultat din cromatografiere a fost redus prin amestec cu 200 μl NaBH_4 (borohidru de sodiu) 5 mg/ml și în final purificat din nou pe Sephadex G25 și eluatul enzimatic amestecat în final cu glicerol în proporție volumică 1:1 (v/v) și depozitat la -20°C în vederea utilizării în tehnica imunochimică. Procedeul de obținere a markerului enzimatic constă în 7 etape, E1...E7.	9
E1) Activarea acidului 2,4-diclorofenoxiacetic	11
O soluție de 25 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 100 mg 1-etil-3-(-3'-diaminopropil)-carbodiimidă în 1 ml dimetilformamidă sunt agitate 3 h în vederea activării grupării carboxi a pesticidului.	13
E2) Cuplarea acidului 2,4-diclorofenoxiacetic cu hexametildiamina	15
Amestecul de pesticid activat rezultat în etapa E1 se introduce peste o soluție de hexametildiamină 8 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6, iar reacția de cuplare s-a desfășurat pe o durată de 3 h.	17
E3) Reacția de oxidare a carbohidratului peroxidazei	19
1 ml peroxidază 5 mg/ml în tampon fosfat 10 mM pH 7,2 a fost tratat cu 0,5 ml soluție de NaIO_4 30 mg/ml timp de 30 min pentru oxidarea carbohidratului enzimei.	21
E4) Purificarea produsului oxidat	23
Soluția rezultată în etapa E3 (1,5 ml) a fost cromatografiată pe coloana de Sephadex G25 ($\Phi = 1 \text{ cm}$, $H = 30 \text{ cm}$) pentru îndepărtarea agentului oxidant.	25

E5) Reacția de cuplare a peroxidazei oxidate cu derivatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic cu hexametilendiamina

Eluatul enzimatic (4,5 mg enzimă) rezultat în etapa E4 a fost amestecat cu 200 μ l soluție de derivat acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilenamina rezultat în etapa E2 pe durata de 3 h.

E6) Purificarea și reducerea bazei Schiff formate

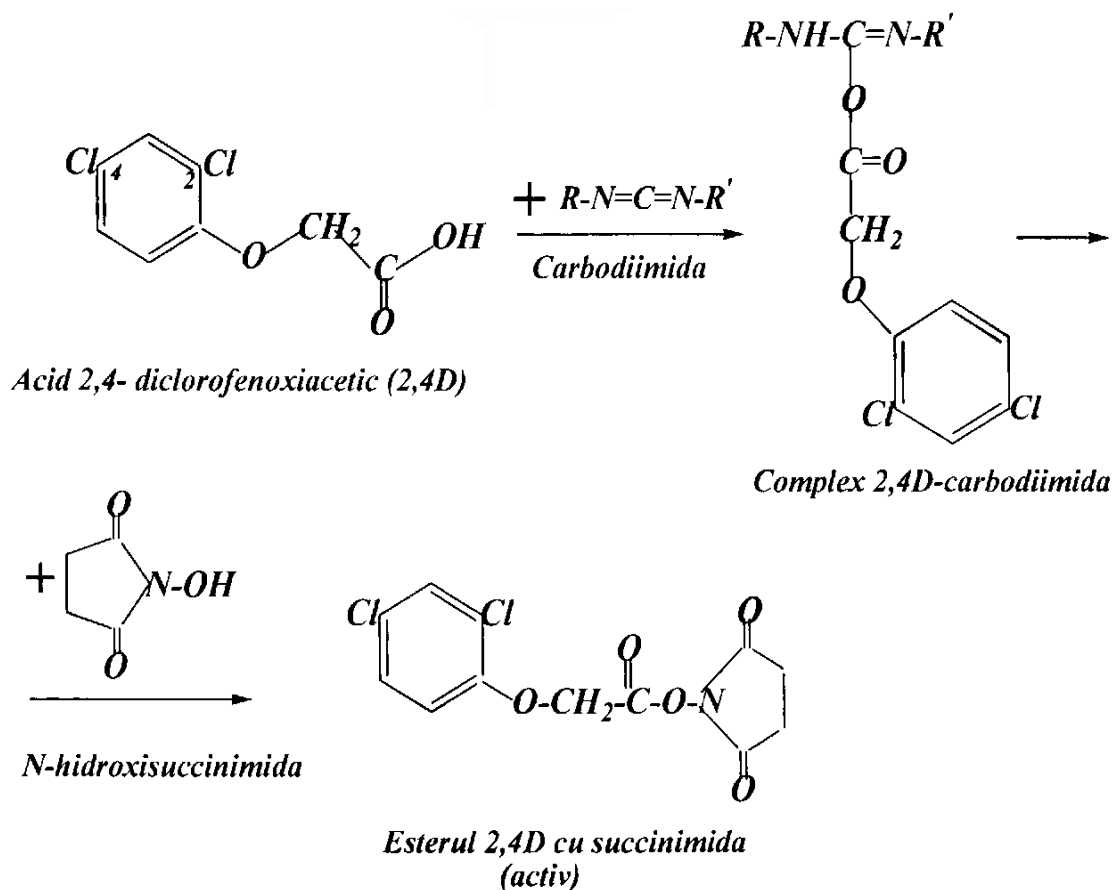
Amestecul chimic din etapa E5 a fost cromatografiat pe Sephadex G25, iar baza Schiff formată a fost redusă cu 200 μ l soluție de NaBH_4 5 mg/ml.

E7) Purificarea markerului enzimatic

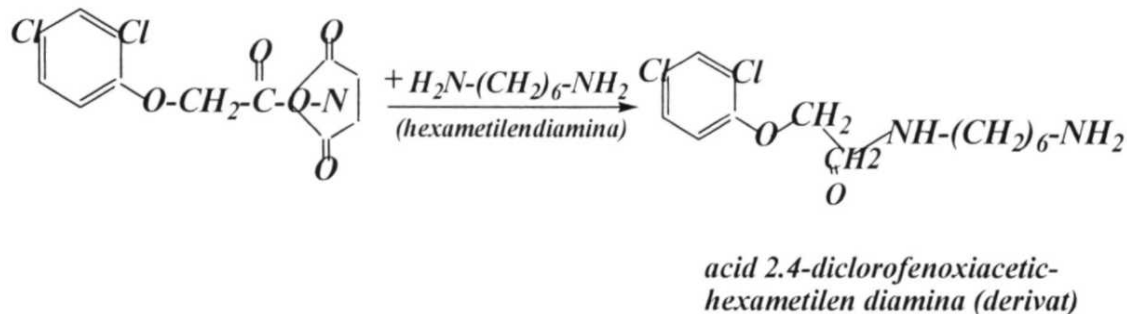
Amestecul din etapa E6 a fost cromatografiat pe Sephadex G25 cu eluent tampon fosfat 10 mM la pH 7,2, iar soluția de marker enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază a fost amestecată cu glicerol în proporție volumică 1:1 (v/v) și depozitată la -20°C în vederea utilizării acesteia în tehnicile imunochimice.

Etape în obținerea markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază

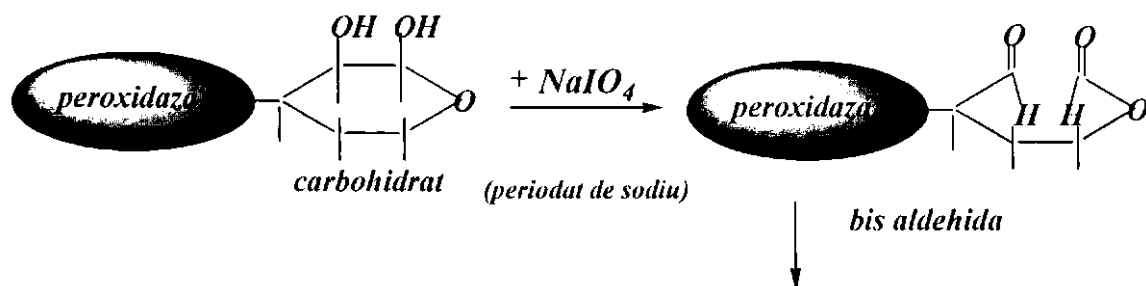
E1: Reacția de activare a acidului 2,4-diclorofenoxiacetic



E2: Reacția de cuplare a acidului 2,4-diclorofenoxiacetic activat cu hexametilen diamina

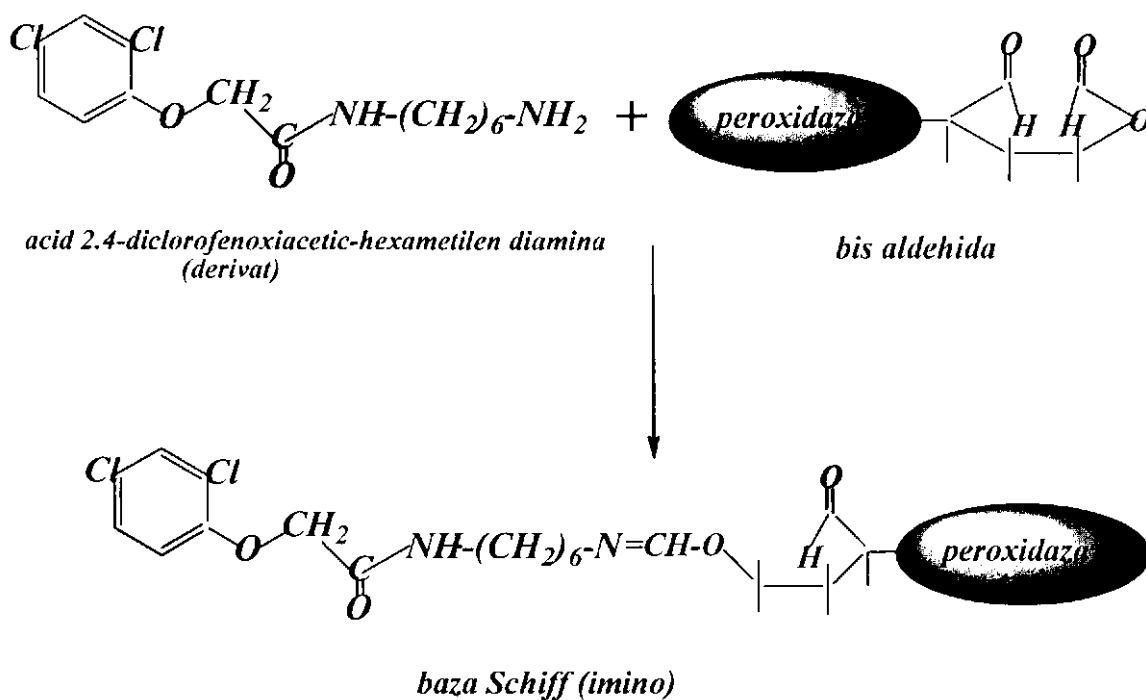


E3: Reacția de oxidare a carbohidratului peroxidazei

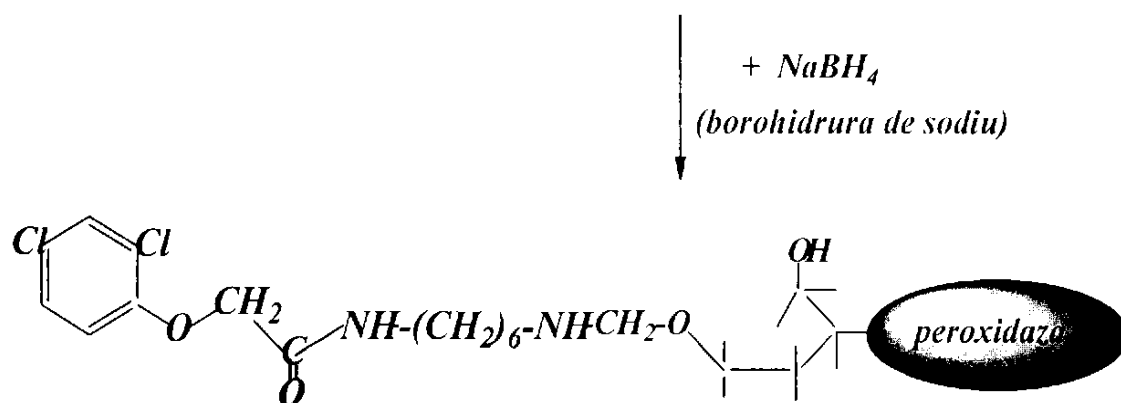


E4: Purificarea produsului oxidat prin cromatografiere pe coloană de Sephadex G25 (operația de îndepărtare a agentului oxidant)

E5: Reacția de cuplare a peroxidazei oxidate cu derivatul acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilen diamina



E6: Reacția de reducere a bazei Schiff formate



RO 129459 B1

Marker enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacet-hexametilendiamin-peroxidază
E7: Purificarea markerului enzimatic

Purificare prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25.

În continuare, se prezintă o serie de date experimentale privind activitatea enzimatică a markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază, care sunt în legătură și cu fig. 1 și 2.

Fig. 1 - cinetica de reacție enzimatică; Condiții de reacție: enzima PRH 10 ng/ml în tampon fosfat 10 mM pH 7,2 și substratul enzimatic 50 μ l TMB 2,5 mg/ml în amestec acid acetic:apă 1:10 (v/v), 50 μ l H₂O₂ 3%. Reacția de oxidare a fost stopată prin separarea cromatografică pe Sephadex G25 a enzimei PRH de oxidant (NaO₄);

Fig. 2 - calculul timpului de înjumătățire al activității enzimatică a PRH obținut din cinetica de reacție la 2 min.

Cantități egale de enzimă peroxidază (PRH peroxidase from horseradish, type VI-A, 1550 unități/mg solid) au fost puse în reacție cu oxidantul NaO₄ 30 mg/ml în tampon fosfat 10 mM pH 7,2. Reacția de oxidare a fost oprită prin separarea componentelor reacției (enzima oxidată, respectiv oxidantul NaO₄) prin cromatografie pe coloana de Sephadex G25, (30 x 1) cm eluent tampon fosfat 10 mM, pH 7,2. Timpii de oxidare ai enzimei PRH aleși au fost 3 min, 30 min, 60 min, 6 h și 24 h. Eluatul care conține enzima oxidată a fost colectat, iar activitatea specifică enzimatică a fost comparată față de martor (enzima fără oxidant). Rezultatele analizei sunt redată în graficul de mai jos.

Tabelul 1

Scăderea activității enzimatică a PRH în timp, în prezența oxidantului NaO₄, unde A_p este activitatea PRH oxidată proporțională cu densitatea optică a PRH măsurată la lungimea de undă de 450 nm (maximul de absorbție al substratului TMB-tetrametilbenzidină oxidat de H₂O₂ în prezența PRH) la 2 min, și A_M este activitatea PRH neoxidată proporțională cu densitatea optică a PRH măsurată la lungimea de undă de 450 nm la 2 min

Timp de oxidare	A_p/A_M (%)
3 min	98,20
30 min	85,40
60 min	70,80
6 h	49,35
24 h	13,26

Concluzie:

La 30 min, activitatea enzimatică în procesul de oxidare al PRH, în comparație cu cea de la 3 min, este de 85,4% față de 98,2%, deci intervalul de timp de oxidare este optim pentru obținerea markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază. Activitatea enzimatică la 24 h duce la o scădere de 84,94% față de cea de la 3 min, rezultând în final, dacă s-ar aplica procedura de oxidare la 24 h, un produs cu activitate enzimatică specifică de 8,49 ori mai mică, ceea ce ar rezulta la scăderea sensibilității de analiză prin folosirea produsului final în sisteme de dozare.

Din datele experimentale de cinetică enzimatică obținute, activitatea enzimei în procesul de oxidare a fost reprezentată considerând modelul:

$$A_p = A_M e^{-\frac{\ln 2}{T_{1/2}} t_{\text{oxidare}}}$$

unde:

A_p - activitatea enzimatică a probei oxidate proporțională cu densitatea optică a probei martor la lungimea de undă de 450 nm;

A_M - activitatea enzimatică a martorului, enzima PRH neoxidată proporțională cu densitatea optică a probei oxidată la lungimea de undă de 450 nm;

$T_{1/2}$ - timpul mediu de oxidare care reduce activitatea enzimei la 50% față de martor (enzima neoxidată) - timp de înjumătățire al activității enzimatic;

$t_{oxidare}$ - este timpul de oxidare în cazul de față de 3 min, 30 min, 60 min, 6 h și 24 h.

Tabelul 2

Datele experimentale utilizate la calculul timpului de înjumătățire al activității enzimatic a PRH

Timp de oxidare	A_p/A_M	$2,303 \log(A_M/A_p)$
3 min	0,9858	0,014
30 min	0,8540	0,158
60 min	0,7081	0,345
6 h	0,4935	0,706
24 h	0,1325	2,021

Din fig. 2, rezultă că $T_{1/2}$, timpul mediu de oxidare care reduce activitatea enzimei la 50% față de martor (enzima neoxidată), este 8,78 h.

1

Revendicare

3

Procedeu de obținere a markerului enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilen-peroxidază, **caracterizat prin aceea că:**

5

- se dizolvă 25 mg acid 2,4-diclorofenoxiacetic, 50 mg N-hidroxisuccinimidă și 100 mg 1-etil-3(-3'-diaminopropil)carbodiimida în 1 ml dimetilformamidă la temperatura camerei, timp de 3 h, rezultând un amestec de pesticid activat, care se introduce peste o soluție de hexametilendiamină 8 mg/ml în tampon carbonat de sodiu 50 mM pH 9,6 și se lasă ca acestea să reacționeze timp de 3 h, obținându-se un derivat acid 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamină;

11

- se oxidează 5 mg de peroxidază cu 0,5 ml NaIO_4 30 mg/ml timp de 30 min, iar apoi se purifică prin cromatografie pe coloană Sephadex G25 pentru îndepărtarea agentului oxidant, rezultând un eluat enzimatic care conține 4,5 ml enzimă;

13

15

- amestecul format de eluatul enzimatic, conținând 4,5 mg enzimă, se supune, timp de 3 h, reacției cu 200 μl soluție de derivat 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamină, produsul 2,4-diclorofenoxiacetic-hexametilendiamin-peroxidază fiind apoi purificat prin cromatografie pe Sephadex G25, redus cu 200 μl NaBH_4 5 mg/ml și purificat din nou pe Sephadex G25, soluția de marker enzimatic acid 2,4-diclorofenoxiacet-hexametilendiamin-peroxidază fiind, în final, amestecată cu glicerol în proporție volumică 1:1 (v/v) și depozitată la -20°C în vederea utilizării în tehnica imunochimică.

17

19

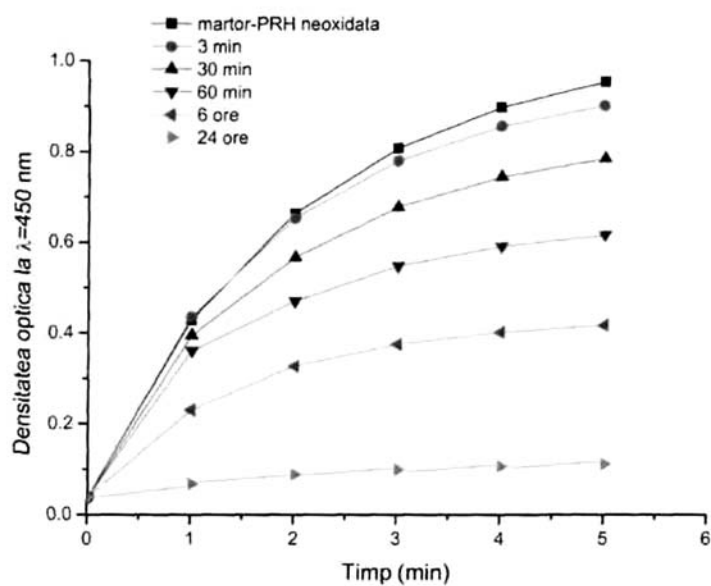


Fig. 1

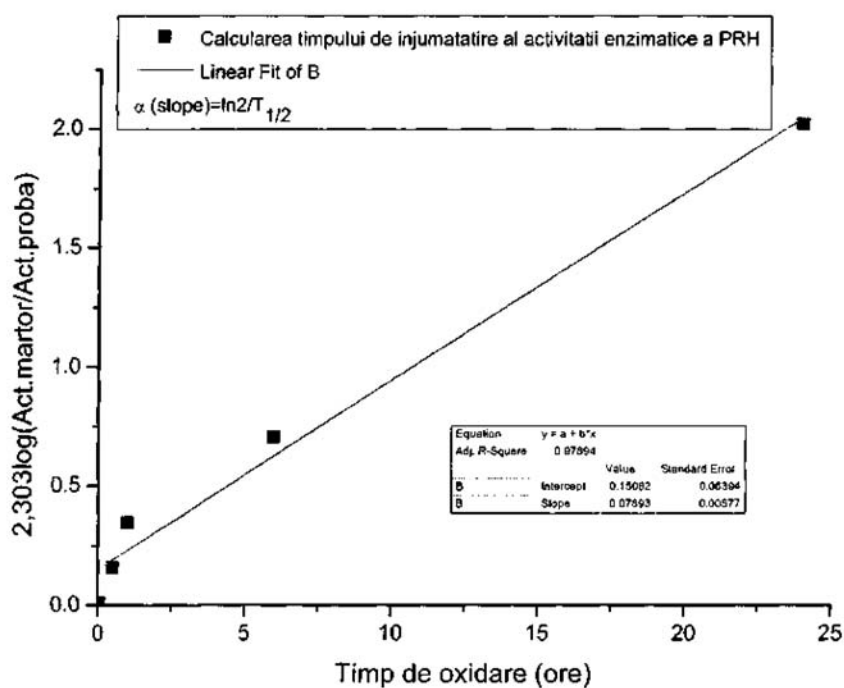


Fig. 2

