

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 102**

51 Int. Cl.:
G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08151414 .3**
96 Fecha de presentación: **14.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **1962095**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA EMISIÓN DE LUZ A PARTIR DE UNA REACCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE.**

30 Prioridad:
23.02.2007 IT BO20070112

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.11.2011

73 Titular/es:
**CYANAGEN SRL
VIA DEGLI STRADELLI GUELF, 40/C
40138 BOLOGNA, IT**

72 Inventor/es:
Della Ciana, Leopoldo

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 102 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para aumentar la emisión de luz a partir de una reacción quimioluminiscente

Campo de la invención

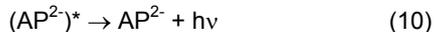
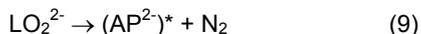
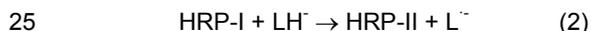
5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para aumentar la emisión de luz generada por la reacción quimioluminiscente del luminol, una enzima peroxidasa, un oxidante y un mediador de electrones.

Técnica antecedente

La reacción quimioluminiscente es entre el luminol, una fuente de peróxido y una enzima peroxidasa, especialmente peroxidasa de rábano rusticano (HRP), que cataliza la oxidación del luminol por el peróxido. Dicha oxidación está acompañada por la emisión de luz.

10 La oxidación quimioluminiscente del luminol catalizada por la peroxidasa encuentra un amplio empleo en ensayos analíticos de antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos, y en particular en ensayos de transferencia, por ejemplo, Dot Blots, transferencias de Western (proteínas), transferencias de Southern y Northern (ácidos nucleicos).

15 Se sabe que la oxidación quimioluminiscente del luminol catalizada por la peroxidasa puede hacerse más rápida y más eficaz añadiendo un mediador, o potenciador de electrones, como se muestra, por ejemplo, por L.J. Kricka en *Clinical Chemistry* 1991; 37:1472-1481; o por L.J. Kricka, J.C. Voyta e I. Bronstein en "Chemiluminescent Methods for Detecting and Quantitating Enzyme Activity", *Methods Enzymol.* 2000; 305:370-390. Se han usado varios compuestos como mediadores de electrones. En particular, la luciferina de luciérnaga, el 6-hidroxibenzotriazol, el *p*-yodofenol, el ácido *p*-cumárico se describen por G.H.G. Thorpe y L.J. Kricka, *Methods Enzymol.* 1986; 133:331; las aminas aromáticas en la patente de estados Unidos N° 4279950; las acetanilidas en la solicitud de patente europea N° 603953 (1994); los indofenoles y las fenotiazinas N-sustituidas y los indofenoles en la patente de Estados Unidos N° 5171668; los ácidos borónico remplazados en la patente de Estados Unidos N° 5629168. Se cree que en presencia de un mediador de electrones, la oxidación del luminol catalizada por la peroxidasa procede del siguiente modo:



35 donde HRP, HRP-I y HRP-II indican la enzima peroxidasa en la forma nativa y en sus dos formas oxidadas, respectivamente; LH^- , LH^- , L, LO_2^{2-} representan el anión luminol, el anión del radical luminol, diazaquinona y el peróxido de luminol; E y E^- representan el mediador de electrones y su radical correspondiente; finalmente, AP^{2-} indica el dianión del ácido 3-aminofáltico, y $(\text{AP}^{2-})^*$ su estado excitado. De acuerdo con este esquema, la peroxidasa HRP se oxida por el peróxido en HRP-I. El anión luminol y el potenciador se oxidan por HRP-I en sus radicales respectivos con la conversión de la enzima en su forma HRP-II. A su vez, HRP-II oxida otra molécula de anión luminol o del mediador de electrones en sus respectivos radicales, regenerando simultáneamente la forma nativa de la enzima HRP, que puede participar en otro ciclo de oxidación. Por tanto se cree que el aumento en la señal quimioluminiscente se debe a la generación más rápida del intermedio clave LH^- en presencia de un mediador de electrones (véase, por ejemplo, S.B. Vlasenko, A.A. Arefyev, A.D. Klimov, B.B. Kim, E.L. Gorovits, A.P. Osipov, E.M. Gavrilova, A.M. Yegorov, J. Biolumin. Chemilumin. 1989; 4:164-176, o B. Cercek, K. Roby, L. Cercek, J. Biolumin. Chemilumin. 1994; 9:273-277).

45 Las fases posteriores de la reacción quimioluminiscente están menos claras. El anión del radical de luminol LH^- es inestable y puede dismutar en el anión luminol LH y diazaquinona, L. La diazaquinona a su vez es probable que sea susceptible al ataque nucleófilo por el ión peróxido HO_2^- en el carbono carbonílico (C=O), con la formación del peróxido de luminol LO_2^{2-} , en la forma abierta o cíclica (endoperóxido). Finalmente, el peróxido de luminol se descompone en 3-aminofáltato, AP^{2-} , con la expulsión de nitrógeno molecular. Algo de la energía producida de este

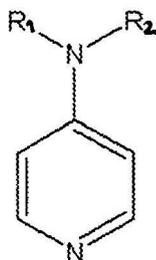
- modo se captura por el aminoftalato con la formación de su estado excitado (AP^{2-})* y la posterior emisión de luz azul (425 nm). La eficacia de este proceso corresponde al rendimiento cuántico de fluorescencia del 3-aminoftalato (aproximadamente el 30%). Aunque no se conocen los detalles exactos de las reacciones (7)-(9), es concebible que la conversión del anión del radical de luminol, $LH^{\cdot-}$, en peróxido de luminol, LO_2^{2-} , implique el ataque nucleófilo del ión peróxido en un carbono carbonílico (C=O) del luminol (véase, por ejemplo, G. Merenyi, J. Lind y T.E. Eriksen "Nucleophilic Addition to Diazaquinones. Formation and Breakdown of Tetrahedral Intermediates in relation to Luminol Chemiluminescence", J. Am. Chem. Soc. 1986; 108:7716-7726). Por otra parte, la eficacia de esta reacción es decisiva para la formación de (Ap^{2-})*.

Objeto y sumario de la invención

- 10 El objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo procedimiento para aumentar la emisión de luz generada por la reacción quimioluminiscente del luminol, una enzima peroxidasa, un oxidante y un mediador de electrones.

De acuerdo con la invención, el objeto anterior se consigue gracias a la solución recordada específicamente en las consiguientes reivindicaciones, que se entiende que forma parte integral de la presente descripción.

- 15 En una realización, esta invención proporciona el uso, en composiciones quimioluminiscentes, de un catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC) que pertenece a la clase de 4-aminopiridinas y particularmente compuestos definidos por la siguiente fórmula (I):



FÓRMULA (I)

- 25 en la que:

R_1 y R_2 representan ambos o cada uno por separado, hidrógeno, metilo, etilo, propilo, butilo e isopropilo, o

R_1 y R_2 juntos representan $-(CH_2)_4-$ formando de este modo un anillo pirrolidona con el átomo de nitrógeno, o

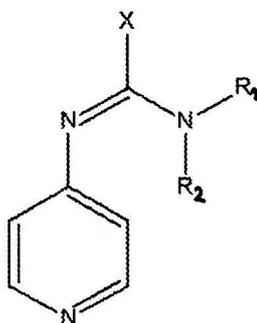
R_1 y R_2 juntos representan $-(CH_2)_5-$ formando de este modo un anillo piperidina con el átomo de nitrógeno, o

- 30 R_1 y R_2 juntos representan $-(CH_2)_2-CHCH_3-(CH_2)_2-$ formando de este modo un anillo 4-metilpiperidina con el átomo de nitrógeno, o

R_1 y R_2 juntos representan $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ formando de este modo un anillo morfolina con el átomo de nitrógeno, o

R_1 y R_2 juntos representan $-(CHCH_3)-CH=CH(CHCH_3)-$ formando de este modo un anillo 2,5-dimetil-2,5-dihidro-1H-pirrol con el átomo de nitrógeno.

- 35 En una realización, esta invención proporciona el uso, en composiciones quimioluminiscentes, de un catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC) que pertenece a la clase de 4-aminopiridinas y particularmente compuestos definidos por la siguiente fórmula (II):



FÓRMULA (II)

en la que:

X representa hidrógeno, metilo, etilo, propilo, butilo o isopropilo, mientras que R₁ y R₂ representan ambos o cada uno por separado, hidrógeno, metilo, etilo, propilo, butilo e isopropilo,

o

- 5 X representa NH₂, o N(metilo)₂, o N(etilo)₂, o N(propilo)₂, o N(isopropilo)₂, o N(butilo)₂, mientras que R₁ y R₂ representan ambos o cada uno por separado, hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, o butilo.

Aunque la presente invención se refiere al uso, en general y para cualquier propósito, de un catalizador de acilación hipernucleófila para aumentar la emisión de luz producida por la reacción quimioluminiscente, es principalmente aplicable, sin embargo, en el contexto de un ensayo.

- 10 El término "ensayo" significa la detección, semicuantificación y cuantificación de un analito. Típicamente, la implementación de un ensayo requiere relacionar la producción de luz con la cantidad de peroxidasa usada, de modo que la peroxidasa es la sustancia determinada directamente. Aunque la presente invención es útil para determinar la presencia o cantidad de cualquiera de los compañeros de reacción (luminol; peroxidasa; oxidante; mediador de electrones; catalizador de acilación hipernucleófila), el compañero de reacción no es necesariamente la propia sustancia a determinar. Por ejemplo, el oxidante puede producirse por una reacción previa, o una serie de reacciones previas.
- 15

La peroxidasa o el luminol pueden estar presentes en forma de un anticuerpo conjugado usado en un ensayo inmunoenzimático para determinar un antígeno. O la peroxidasa o el luminol pueden conjugarse con un nucleótido, un oligonucleótido o un ácido nucleico en ensayos de hibridación. Por lo tanto, la presente invención es aplicable a cualquier procedimiento de ensayo de diagnóstico de una sustancia cuya presencia o cantidad esté relacionada con la presencia o cantidad de un compañero de reacción seleccionado entre el grupo que consiste en luminol, una enzima peroxidasa, un oxidante, un potenciador y un catalizador de acilación hipernucleófila que correaccione en una reacción quimioluminiscente, cuya emisión de luz se detecta o mide de modo que la presencia o cantidad de material a analizar esté relacionada con la producción de luz. La presente invención también incluye un kit para realizar un ensayo que comprende luminol, un oxidante, un mediador de electrones y un catalizador de acilación hipernucleófila.

20

25

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora, a modo de ejemplo solamente, con referencia a las figuras de dibujo adjuntas, en las que:

- 30 - la Figura 1 muestra un gráfico de la señal quimioluminiscente como una función del tiempo en presencia de *N*-dimetilaminopiridina (DMAP);
- la Figura 2 muestra un gráfico de la señal quimioluminiscente como una función del tiempo en presencia de diferentes catalizadores de acilación hipernucleófila de acuerdo con la presente invención;
- 35 - la Figura 3 muestra un gráfico de la señal quimioluminiscente como una función del pH en presencia de diferentes catalizadores de acilación hipernucleófila de acuerdo con la presente invención;
- la Figura 4 muestra un gráfico de la señal quimioluminiscente como una función de la cantidad de peroxidasa de rábano rusticano en presencia de 4-morfolinopiridina (MORP);

- la Figura 5 muestra un gráfico de la señal quimioluminiscente para la detección de *Yersinia enterocolitica* en presencia (■) y en ausencia (□) de HNAC;

- la Figura 6 muestra un gráfico de la señal quimioluminiscente para la detección de alfa-fetoproteína en presencia (•) y en ausencia (o) de HNAC.

5 Descripción detallada de la invención

La búsqueda de catalizadores de acilación nucleófila, capaces de facilitar el ataque del ión peróxido en el carbono carbonílico (C=O) del luminol, y de este modo aumentar la producción de luz por la reacción quimioluminiscente ha conducido a la identificación de un grupo de compuestos con los requisitos necesarios. Estos compuestos, conocidos como catalizadores de acilación hipernucleófila o HNAC, véase por ejemplo E.F.V. Scriven, "4-Dialkylaminopyridines: Super Acylation and Alkylation Catalysts", Chem. Soc. Rev. 1983, 12:129-161, tienen, de hecho, la característica de aumentar muy significativamente la cantidad de luz producida por la oxidación quimioluminiscente del luminol catalizada por peroxidasa y en presencia de mediadores de electrones (potenciadores electroactivos). Además, los compuestos encontrados con actúan como potenciadores electroactivos. Cuando se usan los compuestos objeto de esta invención en lugar de potenciadores electroactivos, de hecho no hay intensificación de la producción de luz a partir de la oxidación del luminol catalizada por peroxidasa.

Desde un punto de vista estructural, los compuestos de esta invención pertenecen a la categoría de 4-aminopiridinas. (A. Hassner, L.R. Krepski, V. Alexanian, Aminopyridines as Acylation Catalysts for Tertiary Alcohols, Tetrahedron 1978, 34:2069-2076; G. Hoefle, W. y Steglich, H. Vorbrueggen, "4-Dialkylaminopyridines as Highly Active Acylation Catalysts ", Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1978; 17:569-583.)

Los catalizadores de acilación hipernucleófila (HNAC) de esta invención, representados por las fórmulas generales (I) y (II), incluyen, en particular 4-dietilaminopiridina, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 4-pirrolidinopiridina (PPY), 4-piperidinopiridina, 4-(4-metilpiperidin-1-il)piridina (MPP), 4-morfolinopiridina (MORP), 4-(2,5-dimetil-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)piridina, *N,N*-dimetil-*N'*-piridin-4-ilimidofórmamida y *N,N,N',N'*-tetrametil-*N'*-piridin-4-il-guanidina.

Se prefieren especialmente MORP, PPY, DMAP y MPP. Estos compuestos son particularmente útiles en ensayos quimioluminiscentes que requieren un alto nivel de producción de luz, tales como ensayos de transferencia, incluyendo transferencias de Western, Southern y Northern, así como ensayos dot blot y de hibridación de ácido nucleico. La concentración de catalizador de acilación hipernucleófila está generalmente en el intervalo entre 0,001 y 20 mmol/litro, preferiblemente entre 0,1 mmol y 10 mmol/litro.

Los mejores resultados se obtienen a altos valores de pH, especialmente en el intervalo de pH entre 8,9 y 9,4. Este intervalo es significativamente mayor que el intervalo de pH óptimo observado en presencia de potenciador, pero en ausencia de catalizador de acilación hipernucleófila, que está habitualmente entre 8,4 y 8,6.

El luminol usado debe ser de una pureza adecuada y apropiada para ensayos de luminiscencia. El luminol puede usarse en la forma de sal sodio. Si el analito a determinar es peroxidasa, la concentración de luminol está generalmente entre 0,1 mmol/litro y 50 mmol/litro, preferiblemente entre 0,5 y 10 mmol/litro. El oxidante puede ser cualquier sustancia capaz de oxidar el luminol con emisión de luz. Se prefiere un peróxido fuente, tal como peróxido de hidrógeno o perborato sódico. La concentración de oxidante usada en ensayos de quimioluminiscencia de peroxidasa está entre 0,1 y 100 mmol/litro, preferiblemente entre 0,5 y 10 mmol/litro.

La enzima peroxidasa es normalmente peroxidasa de rábano rústico (HRP) de una calidad adecuada para su uso en ensayos de luminiscencia. Preferiblemente, la enzima HRP es una isoenzima básica, por ejemplo, Sigma tipo VIA o IX. Puede estar libre o conjugada con un ligando.

El mediador de electrones (potenciador electroactivo) puede ser cualquier sustancia electroactiva capaz de actuar como mediador de electrones entre el oxidante y el luminol. En particular, pueden usarse potenciadores que pertenecen a las siguientes clases de compuestos: benzotiazoles, fenoles, aminas aromáticas, *N*-alquil fenotiazinas, indofenoles, ácidos arilborónicos. Los mediadores de electrones preferidos son: *p*-yodofenol, ácido *p*-yodofenilborónico, sales de ácido 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfónico o ácido 4-(fenotiazin-10-il)butano-1-sulfónico. El mediador de electrones debe ser de una pureza adecuada y apropiada para su uso en ensayos de luminiscencia. En particular, no debe contener impurezas que puedan inhibir la reacción quimioluminiscente. La concentración del mediador de electrones usada en ensayos quimioluminiscentes de peroxidasa está entre 0,001 y 20 mmol/litro, preferiblemente entre 0,1 y 10 mmol/litro.

Las reacciones quimioluminiscentes de esta invención son aplicables para la detección y cuantificación de analitos usando, por ejemplo, la formación de un enlace entre una proteína o ácido nucleico y una membrana y peroxidasa como indicador. La reacción luminiscente se inicia añadiendo a la membrana un sustrato que comprende luminol, una fuente de peróxido, un mediador de electrones y un catalizador de acilación nucleófila. La emisión de luz se prolonga y puede medirse por una película, cámara CDD u otra instrumentación.

Los ensayos quimioluminiscentes basados en las soluciones de sustrato de esta invención incluyen ensayos Dot Blot y de transferencia de Western para proteínas y ensayos de transferencia de Southern y Northern para ácidos

nucleicos. Otra aplicación importante del sustrato quimioluminiscente de la presente invención es en ensayos inmunoenzimáticos ELISA, especialmente para analitos presentes en cantidades extremadamente pequeñas, tales como marcadores tumorales, hormonas tiroideas, proteínas de virus (VIH, VHC).

5 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar aspectos específicos de la invención. Sin embargo, no pretenden limitar la invención.

Todos los reactivos usados en la presente solicitud se han adquirido de Sigma-Aldrich.

Ejemplo 1

Efecto de N-dimetilaminopiridina (DMAP) sobre la emisión quimioluminiscente catalizada por peroxidasa en el sistema luminol/p-yododofenol

10 Todas las mediciones presentadas se hicieron con un espectrofluorímetro Varian Eclipse, en modo Bio/Quimioluminiscencia (longitud de onda de emisión: 425 nm; ranura de emisión: 20 nm). Se prepara un sustrato quimioluminiscente del siguiente modo, que comprende:

- luminol 3 mM, sal sódica
- p-yododofenol 2 mM (mediador de electrones)

15 - perborato sódico 4 mM

- 4-dimetilaminopiridina 5 mM (HNAC)

- tampón Tris 0,15 M, pH 9,0

Además, se prepara un sustrato de control, con la misma composición que la previa, pero sin 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Después, se añaden a una cubeta de polimetilmetacrilato que contiene 2 ml de solución de sustrato, 10 µl

20 de una solución de 0,5 µg/ml de peroxidasa de rábano rusticano (HRP-Tipo VIA). La solución se mezcla durante unos pocos segundos con un vórtice y la medición de la señal luminiscente se realiza durante un periodo de 10 min. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1. Como puede observarse, el sustrato que contiene el catalizador de acilación hipernucleófila DMAP produce una señal significativamente mayor que el sustrato de control, que está desprovisto del mismo.

25 Ejemplo 2

Efecto de catalizadores de acilación hipernucleófila sobre la emisión quimioluminiscente del luminol

Todas las mediciones presentadas se hicieron con un espectrofluorímetro Varian Eclipse, en modo Bio/Quimioluminiscencia (longitud de onda de emisión: 425 nm; ranura de emisión: 5 nm). Se preparan los siguientes sustratos quimioluminiscentes del siguiente modo, que comprenden:

- 30 - luminol 5 mM, sal sódica
- 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato sódico 3 mM
- perborato sódico 4 mM (oxidante)
- catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC):
- Sustrato A, ninguno;
- 35 Sustrato B, 4-pirrolidinopiridina (PPY) 3 mM
- Sustrato C, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) 3 mM
- Sustrato D, 4-morfolinopiridina (MORP) 3 mM
- tampón Tris 0,15 M, pH 9,0.

Después, se prepara una serie de cubetas de polimetilmetacrilato, conteniendo cada una 2 ml de una solución de sustrato. A cada cubeta se añaden 10 µl de una solución de 0,5 µg/ml de peroxidasa de rábano rusticano (HRP-Tipo VIA). La solución se mezcla durante unos pocos segundos con un vórtice y la medición de la señal luminiscente se realiza durante un periodo de 10 min. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. Como puede observarse, durante este periodo de tiempo la señal quimioluminiscente generada por sustratos que contienen HNAC (Sustratos B, C, y D) es de 6 a 12 veces más intensa en comparación con el Sustrato A, que está libre del mismo.

40

Ejemplo 3**Dependencia en el pH del efecto de HNAC (MORP, DMAP, PPY) sobre la emisión quimioluminiscente del luminol**

5 Las mediciones se realizaron con un espectrofluorímetro Varian Eclipse, en modo Bio/Quimioluminiscencia (longitud de onda de emisión: 425 nm; ranura de emisión: 5 nm; filtro de emisión: abierto; potencia del fotomultiplicador: media). Se preparan cuatro soluciones con la siguiente composición:

- luminol sódico 5,0 mM
- perborato sódico 4,0 mM
- 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato sódico 3,0 mM
- HNAC 3,0 mM (DMAP, MORP o PPY)

10 - tampón Tris 0,15 M, pH 9,2

Después, se prepara una serie de cubetas de polimetilmetacrilato, conteniendo cada una 2 ml de una solución de sustrato. A cada cubeta se añaden pequeñas cantidades de HCl 5 M o NaOH 5 M, para ajustar el pH en el intervalo de 8,0-10,0 sin producir en ningún caso cambios significativos en el volumen total. A cada cubeta se añaden 10 μ l de una solución de 0,5 μ g/ml de peroxidasa de rábano rusticano (HRP-Tipo VIA). La solución se mezcla durante unos pocos segundos con un vórtice y se realiza la medición de la señal luminiscente. Para cada reacción, se registra la intensidad de la señal luminosa integrada durante los primeros 600 segundos. A partir de los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 3, puede observarse que en todos los casos la señal quimioluminiscente alcanza el valor máximo entre pH 8,9 y pH 9,4. En ausencia de HNAC, la señal óptima se obtiene en el intervalo de pH entre 8,4 y 8,6. Esta diferencia en el comportamiento puede atribuirse a la mayor concentración de HNAC no protonado (especies hipernucleófilas) en el sustrato a mayores valores de pH (el pK_a de MORP, DMAP y PPY es 8,8, 9,7 y 9,9, respectivamente).

Ejemplo 4**Sustrato para medir la peroxidasa por quimioluminiscencia**

25 Una solución de trabajo (sustrato de quimioluminiscencia) para la medición de la peroxidasa puede obtenerse mezclando partes iguales de las siguientes soluciones:

Solución A:

- luminol 10 mM, sal sódica
 - 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato sódico 6 mM
 - HNAC 3 mM (catalizador de acilación hipernucleófila)
- 30 - tampón Tris 0,3 M, pH 9,2-9,8 (véase la nota)

Solución B:

- perborato sódico 8 mM
- tampón acetato 50 mM, pH 5,0

Por lo tanto, la solución de trabajo (sustrato de quimioluminiscencia) contiene:

- 35 - luminol 5,0 mM, sal sódica
- 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato sódico 3,0 mM
- HNAC 3,0 mM (catalizador de acilación hipernucleófila)
- perborato sódico 4,0 mM.

40 El pH del tampón Tris 0,3 M de la Solución A puede ajustarse de modo que el pH de la solución de trabajo esté entre 8,6 y 9,4.

Ejemplo 5**Límite de detección de peroxidasa**

En una lámina de membrana de nitrocelulosa habitualmente usada para ensayos de transferencia de Western, cortada a aproximadamente 2,5 x 5,0 cm, se creó una serie de manchas con 2 soluciones que contenían diferentes concentraciones de peroxidasa de rábano rústicano (HRP Tipo VI-A) en tampón Tris 0,1 M, pH 7,4 con BSA (albúmina sérica bovina) añadida. Cada mancha se repitió tres veces, creando de este modo una matriz de manchas 3 x 7 sobre la membrana. La membrana se secó al aire y después se lavó dos veces con tampón Tris 0,1 M, pH 7,4. Una vez seca, la membrana se puso en un portaobjetos de microscopio y se insertó en un instrumento de formación de imágenes NightOwl (Berthold Technologies). Después se preparó una solución de trabajo mezclando:

- 500 µl de solución A preparada como en el Ejemplo 4 y usando 4-morfolinopiridina (MORP) como HNAC (catalizador de acilación hipernucleófila).

- 500 µl de solución B preparada como en el Ejemplo 4

con las que se impregnó la membrana. Después de 5 minutos, se integró la señal durante 300 segundos; se realizaron lecturas de 10 segundos cada 5 minutos durante media hora. Los datos obtenidos se muestran en la siguiente Tabla:

Nº de fila	Peroxidasa de rábano rústicano	Intensidad de señal (promedio de 3 manchas)
1	19	3236
2	16	2804
3	12	2377
4	9	1309
5	6	718
6	3	350
7	0	198

Los datos correspondientes se representan en un gráfico, Figura 4, a partir del cual se obtiene un límite de detección (LOD) para la peroxidasa de rábano rústicano (HRP, masa molecular = 44.000 dalton) de 1,8 pg (41 amol). Por otro lado, usando un sustrato quimioluminiscente preparado como en el Ejemplo 4, pero sin HNAC se obtiene como resultado un LOD de 10 pg (230 amol). Asimismo, la curva de respuesta a dosis de la peroxidasa de rábano rústicano (L.J. Kricka, M. Cooper y Xiaoying Ji, "Synthesis and Characterization of 4-iodophenylboronic Acid: A New Enhancer for the Horseradish Peroxidase Chemiluminescent-Catalyzed Oxidation of Luminol", Anal. Biochem. 1996; 240:119-125) sobre un sustrato quimioluminiscente luminol-peróxido potenciado con ácido *p*-yodofenilborónico pero sin HNAC obtiene como resultado un LOD de 509 amol. Por lo tanto, el sustrato quimioluminiscente preparado como se ha descrito en el Ejemplo 4 y que contiene HNAC, permite la determinación de peroxidasa de rábano rústicano, con una sensibilidad al menos 6-12 veces mayor que los sustratos correspondientes que contienen un mediador de electrones, pero sin HNAC.

Ejemplo 6**Ensayo de transferencia de Western sobre lisado de Yersinia enterocolítica**

El procedimiento de transferencia usado se describe por H. Towbin y col. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350-4353 (1979). Se separaron diversas concentraciones de lisado de Yersinia enterocolítica por electroforesis en gel sobre gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) al 12%. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para la transferencia de Western. Los sitios de unión no específica se bloquearon con una solución de leche en polvo al 5% durante 1 hora y después se lavaron varias veces con un tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 137 mM). Las transferencias se incubaron después con el anticuerpo primario (anti-YeEnt de conejo, dilución 1:10.000) durante una hora, después se lavaron como anteriormente para retirar el anticuerpo no unido al antígeno. La membrana con la transferencia se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario marcado con HRP (de cabra anti-ratón HRP, Sigma A-6154, dilución 1:3000), con posterior lavado. La membrana se cortó en dos partes. Se prepararon dos soluciones de trabajo de acuerdo con el Ejemplo 4, con HNAC (4-morfolinopiridina) o sin HNAC. Las soluciones de trabajo se añadieron a las membranas y se incubaron durante cinco minutos. La señal quimioluminiscente se obtuvo con un instrumento de formación de imágenes (NightOwl, Berthold Technologies) durante 1 minuto. La Figura 5 ilustra la intensidad de la señal obtenida usando las dos soluciones. Es evidente que

la solución de sustrato que contiene HNAC de acuerdo con esta invención muestra un brillo y una sensibilidad considerablemente mayores que la solución que carece de HNAC.

Ejemplo 7

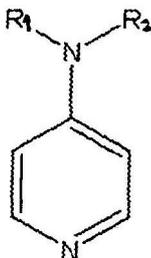
Ensayo ELISA de α -fetoproteína (AFP)

5 Este ensayo inmunométrico se basa en la reacción inmunoquímica entre un anticuerpo de captura, un antígeno (α -fetoproteína, AFP), y un anticuerpo marcado con HRP. Se prepararon pocillos con anticuerpo de captura incubando las placas de micropocillos revestidas con estreptavidina con una solución de anticuerpo de captura biotinilado. Los pocillos después se incubaron con calibradores de α -fetoproteína (AFP) a partir de un kit comercial. Se añadieron 25 μ l de un calibrador de AFP a cada pocillo. Después de un periodo de incubación de una hora, la placa se lavó con
10 PBS-Tween-20 al 0,05%. Después se añadieron 200 μ l de una solución de anticuerpo anti-AFP marcado con HRP a cada pocillo. Los pocillos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y después se lavaron para retirar el exceso de conjugado. Se prepararon dos soluciones de trabajo de acuerdo con el Ejemplo 4, con HNAC (4-dimetilaminopiridina) o sin HNAC. Las soluciones de trabajo se añadieron a los pocillos y se incubaron durante diez minutos. La señal quimioluminiscente se obtuvo con un lector de placa (Luminoskan Ascent LabSystems) durante 1
15 minuto. La Figura 6 muestra la curva de respuesta a dosis para AFP. De nuevo, está claro que la solución que contiene HNAC de esta invención muestra una señal mayor y por consiguiente una sensibilidad significativamente mayor en comparación con la solución que carece de HNAC.

Naturalmente, aunque el principio de la invención sigue siendo el mismo, los detalles de construcción y las realizaciones puede variar ampliamente con respecto a lo que se ha descrito e ilustrado simplemente a modo de
20 ejemplo, sin alejarse del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

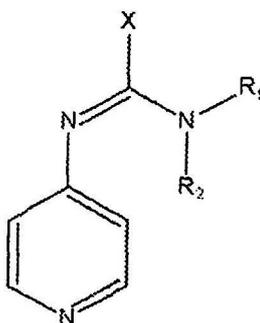
1. Un procedimiento para aumentar la emisión de luz producida por la reacción quimioluminiscente del luminol, una enzima peroxidasa, un oxidante y un mediador de electrones, **caracterizado porque** dicha reacción quimioluminiscente sucede en presencia de un catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC).
- 5 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC) se selecciona entre el grupo de compuestos representados por la Fórmula (I):



FÓRMULA (I)

en la que:

- R₁ y R₂ representan ambos o cada uno por separado, hidrógeno, metilo, etilo, propilo, butilo e isopropilo,
o
- 10 R₁ y R₂ juntos representan -(CH₂)₄- formando de este modo un anillo pirrolidona con el átomo de nitrógeno, o
R₁ y R₂ juntos representan -(CH₂)₅- formando de este modo un anillo piperidina con el átomo de nitrógeno, o
R₁ y R₂ juntos representan -(CH₂)₂-CHCH₃-(CH₂)₂- formando de este modo un anillo 4-metilpiperidina con el átomo de nitrógeno, o
- 15 R₁ y R₂ juntos representan -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂- formando de este modo un anillo morfolina con el átomo de nitrógeno,
o
R₁ y R₂ juntos representan -(CHCH₃)-CH=CH(CHCH₃)- formando de este modo un anillo 2,5-dimetil-2,5-dihidro-1H-pirrol con el átomo de nitrógeno.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC) se selecciona entre el grupo de compuestos representados por la Fórmula (II):



FÓRMULA (II)

20 en la que:

X representa hidrógeno, metilo, etilo, propilo, butilo o isopropilo, mientras que R₁ y R₂ representan ambos o cada uno por separado, hidrógeno, metilo, etilo, propilo, butilo e isopropilo, o

X representa NH₂, o N(metilo)₂, o N(etilo)₂, o N(propilo)₂, o N(isopropilo)₂, o N(butilo)₂, mientras que R₁ y R₂ representan ambos o cada uno por separado, hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, o butilo.

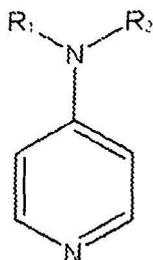
4. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** dicho catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC) se selecciona entre 4-dietilaminopiridina, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 4-pirrolidinopiridina (PPY), 4-piperidinopiridina, 4-(4-metilpiperidin-1-il)piridina (MPP), 4-morfolinopiridina (MORP), 4-(2,5-dimetil-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)piridina, *N,N*-dimetil-*N'*-piridin-4-ilimidofórmamida y *N,N,N,N'*-tetrametil-*N''*-piridin-4-il-guanidina.
5. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** dicha enzima peroxidasa está libre o conjugada con un ligando.
6. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** dicha enzima peroxidasa es peroxidasa de rábano rústicano.
7. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** dicho oxidante es perborato sódico.
8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** dicho mediador de electrones es *p*-yodofenol.
9. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** dicho mediador de electrones es 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato sódico.
10. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** dicha reacción quimioluminiscente se realiza a un pH entre 8,0 y 10.
11. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico para la detección de un analito en una muestra, **caracterizado porque** dicho procedimiento comprende:
- a. la reacción de dicha muestra con un reactivo específico para dicho analito, en la que dicho reactivo específico está marcado con luminol o peroxidasa, con la formación de un complejo analito-reactivo marcado;
- b. la reacción de dicho complejo analito-reactivo marcado con una solución que comprende un oxidante, un mediador de electrones, un catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC) y i) luminol, si el reactivo específico para dicho analito está marcado con peroxidasa, o ii) peroxidasa, si el reactivo específico para dicho analito está marcado con luminol, que reaccionan en una reacción quimioluminiscente con emisión de luz y
- c. la detección de dicho analito mediante la medición de dicha emisión de luz.
12. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** dicho procedimiento comprende:
- a. la reacción de dicha muestra con un reactivo de captura específico para dicho analito con la formación de un complejo analito-reactivo de captura;
- b. la reacción de dicho complejo analito-reactivo de captura con dicho reactivo específico para dicho analito marcado con luminol o peroxidasa con la formación de un complejo reactivo marcado-analito-reactivo de captura;
- c. la reacción de dicho complejo reactivo marcado-analito-reactivo de captura con una solución que comprende un oxidante, un mediador de electrones, un catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC) y i) luminol, si dicho reactivo específico para dicho analito está marcado con peroxidasa, o ii) peroxidasa, si dicho reactivo específico para dicho analito está marcado con luminol, que reaccionan en una reacción quimioluminiscente con emisión de luz, y
- d. la detección de dicho analito mediante la medición de dicha emisión de luz.
13. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** dicho procedimiento comprende:
- a. la reacción de dicha muestra con dicho reactivo específico para dicho analito marcado con luminol o peroxidasa con la formación de un complejo analito-reactivo marcado;
- b. la reacción de dicho complejo analito-reactivo marcado con un reactivo de captura específico para dicho analito con la formación de un complejo reactivo marcado-analito-reactivo de captura;
- c. la reacción de dicho complejo reactivo marcado-analito-reactivo de captura con una solución que comprende un oxidante, un mediador de electrones, un catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC) y i) luminol, si dicho reactivo específico para dicho analito está marcado con peroxidasa, o ii) peroxidasa, si dicho reactivo específico para dicho analito está marcado con luminol, que reaccionan en una reacción quimioluminiscente con emisión de luz, y
- d. la detección de dicho analito mediante la medición de dicha emisión de luz.

14. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, **caracterizado porque** dicho reactivo de captura está fijado en una fase sólida.

5 15. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, **caracterizado porque** dicho reactivo de captura se selecciona entre un antígeno, un anticuerpo, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico monocatenario, un ácido nucleico bicatenario.

16. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, **caracterizado porque** dicho reactivo marcado se selecciona entre un antígeno, un anticuerpo, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico monocatenario, un ácido nucleico bicatenario.

10 17. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, **caracterizado porque** dicho catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC) es un compuesto seleccionado entre el grupo de compuestos representados por la Fórmula (I):



FÓRMULA (I)

en la que

R₁ y R₂ representan ambos o cada uno por separado, hidrógeno, metilo, etilo, propilo, butilo e isopropilo, o

R₁ y R₂ juntos representan -(CH₂)₄- formando de este modo un anillo pirrolidona con el átomo de nitrógeno, o

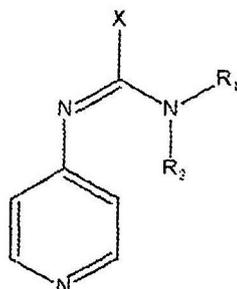
15 R₁ y R₂ juntos representan -(CH₂)₅- formando de este modo un anillo piperidina con el átomo de nitrógeno, o

R₁ y R₂ juntos representan -(CH₂)₂-CHCH₃-(CH₂)₂- formando de este modo un anillo 4-metilpiperidina con el átomo de nitrógeno, o

R₁ y R₂ juntos representan -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂- formando de este modo un anillo morfolina con el átomo de nitrógeno, o

20 R₁ y R₂ juntos representan -(CHCH₃)-CH=CH(CHCH₃)-formando de este modo un anillo 2,5-dimetil-2,5-dihidro-1H-pirrol con el átomo de nitrógeno.

18. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, **caracterizado porque** dicho catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC) es un compuesto seleccionado entre el grupo de compuestos representados por la Fórmula (II):



FÓRMULA (II)

25 en la que:

X representa hidrógeno, metilo, etilo, propilo, butilo o isopropilo, mientras que R₁ y R₂ representan ambos o cada uno por separado, hidrógeno, metilo, etilo, propilo, butilo e isopropilo, o

X representa NH₂, o N(metilo)₂, o N(etilo)₂, o N(propilo)₂, o N(isopropilo)₂, o N(butilo)₂, mientras que R₁ y R₂ representan ambos o cada uno por separado, hidrógeno, metilo, etilo, propilo, isopropilo, o butilo.

19. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, **caracterizado porque** el oxidante es perborato sódico.
- 5 20. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, **caracterizado porque** el mediador de electrones es 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato sódico o *p*-yodofenol.
- 10 21. Un procedimiento para realizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 20, **caracterizado porque** el catalizador de acilación hipernucleófila (HNAC) se selecciona entre 4-dietilaminopiridina, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 4-pirrolidinopiridina (PPY), 4-piperidinopiridina, 4-(4-metilpiperidin-1-il)piridina (MPP), 4-morfolinopiridina (MORP), 4-(2,5-dimetil-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)piridina, *N,N*-dimetil-*N'*-piridin-4-ilimido-formamida y *N,N,N',N'*-tetrametil-*N''*-piridin-4-il-guanidina.
- 15 22. Kit para realizar un ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 21, comprendiendo el kit luminol, un oxidante, un mediador de electrones y un catalizador de acilación hipernucleófila como se define en las reivindicaciones 2 y 3.

FIGURA 1

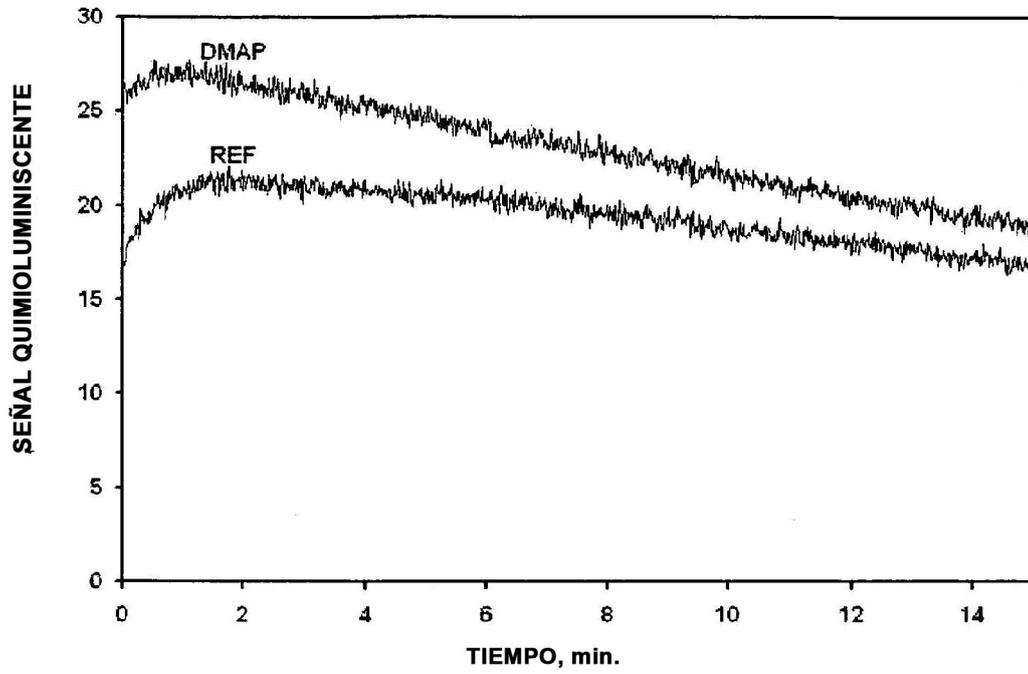


FIGURA 2

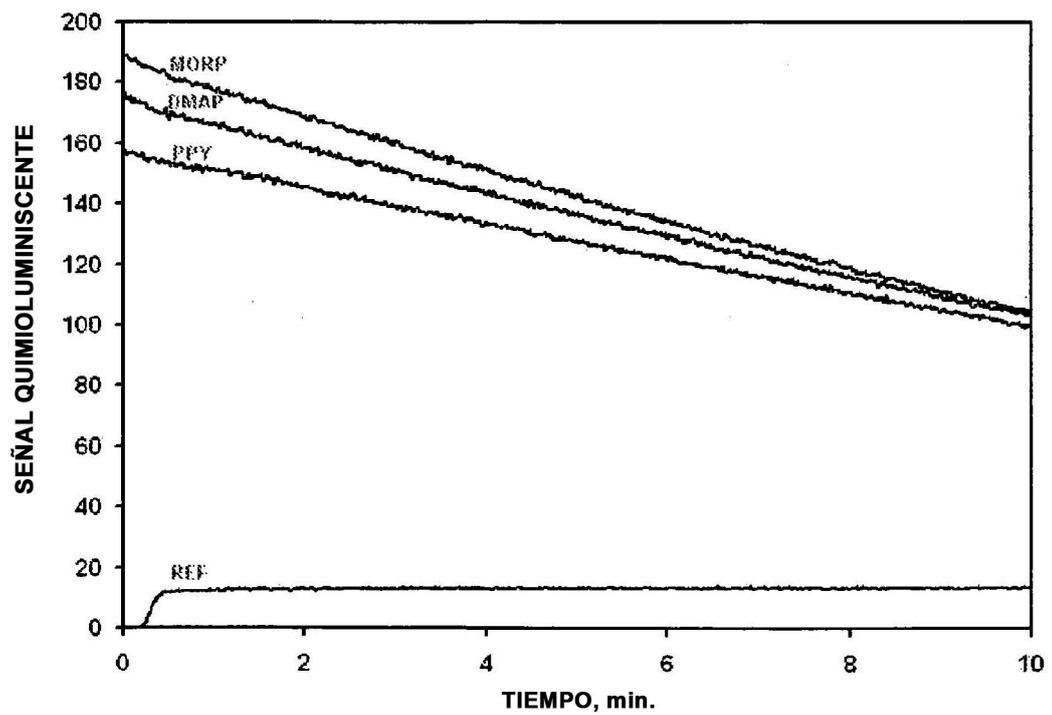


FIGURA 3

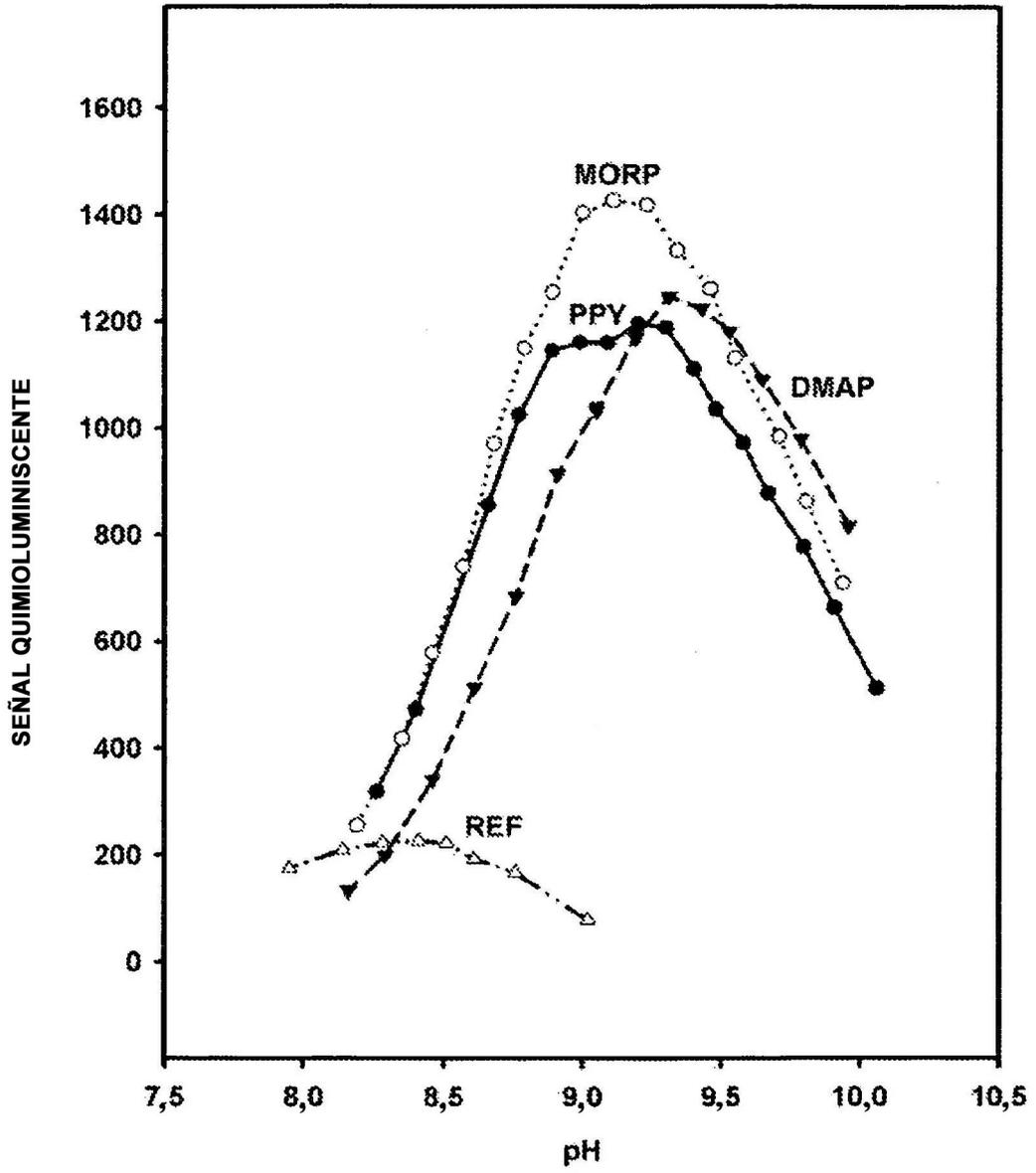


FIGURA 4

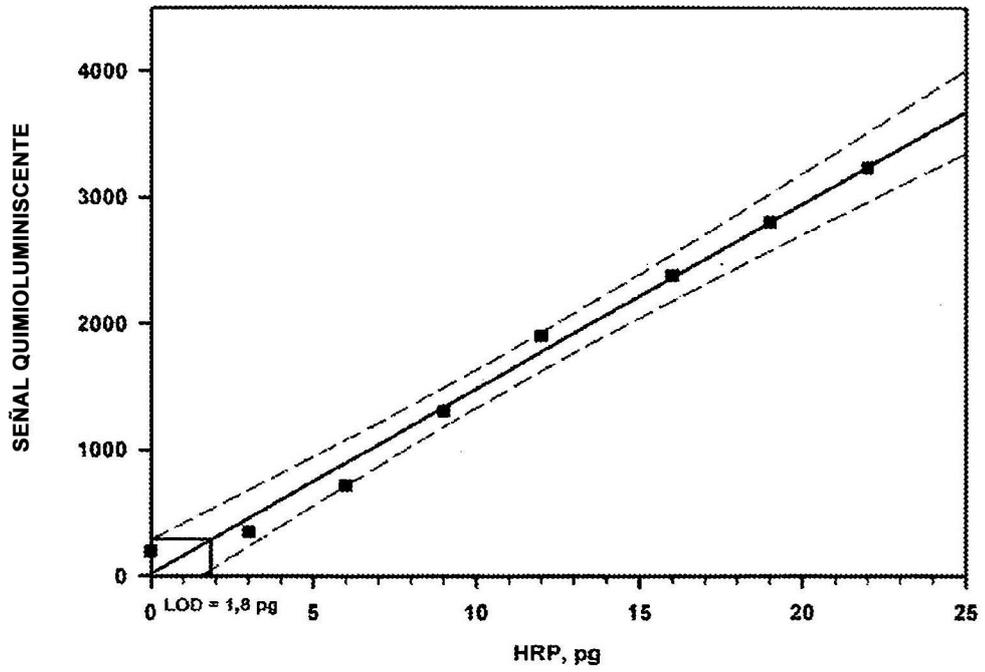


FIGURA 5

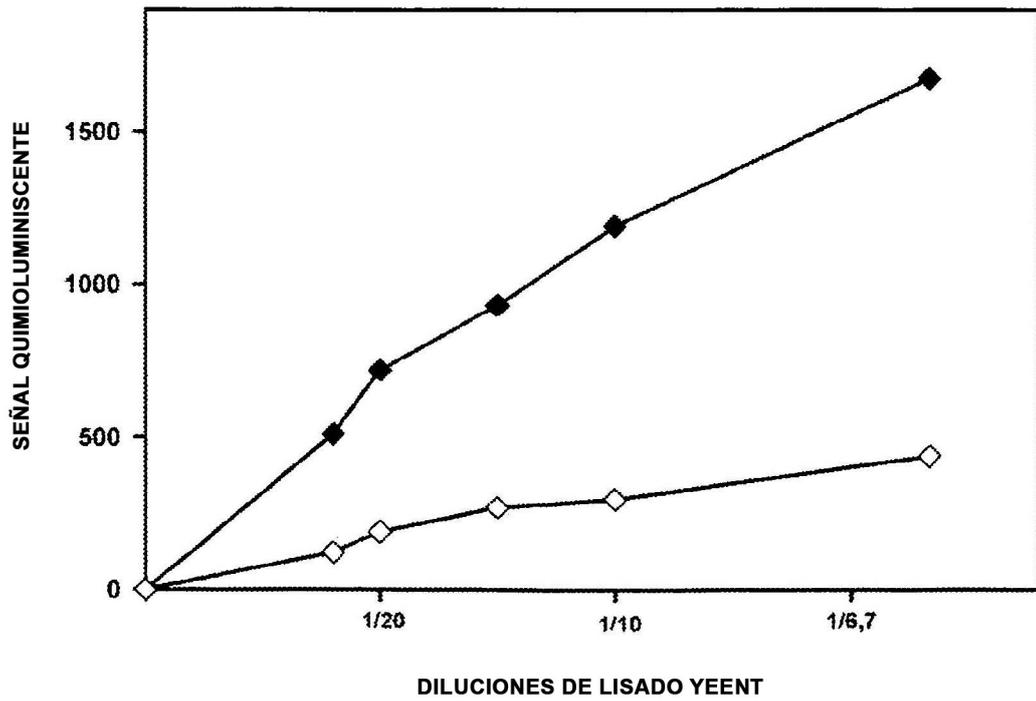


FIGURA 6

