

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 424**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/28 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2011 E 11172336 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2405016**

54 Título: **Procedimiento para aumentar y regular la emisión de luz de una reacción quimioluminiscente**

30 Prioridad:

06.07.2010 IT TO20100580

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

30.05.2018

73 Titular/es:

**CYANAGEN SRL (100.0%)
Via degli Stradelli Guelfi, 40/C
40138 Bologna, IT**

72 Inventor/es:

**DELLA CIANA, LEOPOLDO;
RODEGHIERO, FEDERICA y
PERCIACCANTE, ROSSANA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 670 424 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 y regular la emisión de luz de una reacción quimioluminiscente

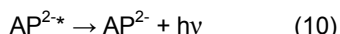
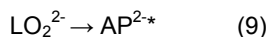
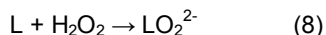
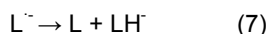
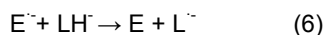
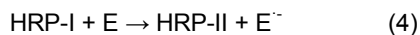
Campo de la invención

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

Antecedentes de la técnica

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

Se sabe que la oxidación quimioluminiscente del luminol catalizada por peroxidasa puede hacerse más rápida y ser más eficaz mediante la adición de un mediador de electrones, o potenciador, tal como muestra, por ejemplo, L.J. Kricka en Clinical Chemistry 1991; 37:1472-1481; o L.J. Kricka, J.C. Voyta e I. Bronstein en "Chemiluminiscent Methods for Detecting and Quantitating Enzyme Activity", Methods Enzymol. 2000; 305:370-390. Se han usado varios compuestos como mediadores de electrones, incluyendo luciferina, 6-hidroxibenzotriazoles, p-yodofenoles, ácido p-cumárico, que se describen en G.H.G. Thorpe y L. J. Kricka, Methods Enzymol. 1986; 133:331; aminas aromáticas en la patente estadounidense n.º 4.279.950; acetanilidas en la solicitud de patente europea n.º 603953 (1994); fenotiazinas N-sustituidas en la patente estadounidense n.º 5.171.688; ácidos bóricos en la patente estadounidense n.º 5.629.168. Se cree que, en presencia de un mediador de electrones, la oxidación del luminol catalizada por peroxidasa transcurre según el siguiente esquema:



en el que HRP, HRP-I y HRP-II indican la enzima peroxidasa en la forma natural y en sus dos formas oxidadas, respectivamente; LH⁻, L⁻, L y LO₂²⁻ representan el anión de luminol, el anión del radical de luminol, la diazaquinona y el peróxido de luminol; E and E⁻ representan el mediador de electrones, o el potenciador primario, y su radical correspondiente; finalmente, AP²⁻ indica el dianión del ácido 3-aminofáltico y AP^{2-*} su estado excitado. Según el presente esquema, la peroxidasa HRP se oxida mediante el peróxido para dar HRP-I. El anión de luminol y el potenciador primario se oxidan mediante HRP-I para dar sus respectivos radicales con la conversión de la enzima en su forma HRP-II. A su vez, la HRP-II oxida otra molécula del anión de luminol o del potenciador primario para dar sus respectivos radicales, regenerando simultáneamente la forma natural de la enzima HRP, que puede intervenir en otro ciclo de oxidación.

El aumento en la emisión de luz observada en presencia de un mediador de electrones E se atribuye a la generación más rápida del producto intermedio clave L⁻ (véase, por ejemplo, S.B. Vlasenko, A.A. Arefeyev, 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). Una vez se forma, L⁻ se dismuta rápidamente para dar aniones LH⁻ de luminol y diazaquinona, L. La diazaquinona es susceptible al ataque nucleófilo sobre el carbono carbonílico (C=O) por el peróxido, con formación de peróxido de luminol. Finalmente, el peróxido de luminol se colapsa para dar 3-aminofalato en su forma excitada, AP^{2-*} con expulsión simultánea de nitrógeno molecular. El estado excitado del 3-aminofalato emite entonces un fotón de color azul en 425 nm.

Se obtuvo un aumento adicional y significativo en la emisión de luz quimioluminiscente a través del uso de determinados catalizadores de acilación, tal como se describe en el documento EP 1962095 o en la solicitud de patente estadounidense 2008/0241686 y en E. Marzocchi, S. Grilli, L. Della Ciana, L. Prodi, M. Mirasoli, A. Roda,

Anal. Biochem. 2008; 277:189-194. Estos compuestos, que pertenecen a la clase de las 4-aminopiridinas, proporcionan una potenciación adicional en la emisión de luz únicamente cuando se usan en conjunción con potenciadores primarios del tipo de transferencia de electrones. Por tanto, estos pueden describirse como "potenciadores secundarios", véanse, por ejemplo, las siguientes referencias: M. M. Vdovenko, L. Della Ciana, I. Yu. Sakharov, Anal. Biochem. 2009; 392:54-58. Los procedimientos adicionales para aumentar la emisión de luz producida por la reacción quimioluminiscente del luminol, una enzima peroxidasa, un oxidante, un potenciador primario y un potenciador secundario se desvelan, entre otros, en los documentos US 4950588 y US 2003/073150.

Aunque los catalizadores de 4-aminopiridina de la solicitud de patente estadounidense 2008/0241686 tienen un efecto potente sobre la eficacia de la reacción quimioluminiscente del luminol, estos son difíciles de regular. Incluso cantidades muy pequeñas de los compuestos producen un gran aumento en la señal. Además, la señal se desvanece mucho más rápido que en su ausencia. Sin embargo, existen ventajas en cuanto a la provisión de formulaciones capaces de producir una emisión de luz aumentada combinada con una velocidad relativamente baja de desvanecimiento de señal. Estas características son especialmente valiosas cuando se necesitan lecturas repetidas.

Por estos motivos, resulta un progreso valioso en el estado de la técnica la provisión de potenciadores secundarios con un mejor grado de regulación de la amplificación de la señal, en comparación con el obtenido con las 4-aminopiridinas de la solicitud de patente estadounidense 2008/0241686.

Objeto y sumario de la invención

Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento nuevo para aumentar y regular la emisión de luz generada por la reacción quimioluminiscente del luminol, una peroxidasa, un oxidante y un mediador de electrones.

Según la invención, el objeto anterior se logra gracias a las composiciones especificadas en las reivindicaciones siguientes, que se entiende que forman una parte integral de la presente descripción.

La presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar y regular la emisión de luz en términos de señal de luz inicial y duración de señal de luz producida por la reacción quimioluminiscente del luminol, una enzima peroxidasa, un oxidante y un potenciador primario, en el que la reacción quimioluminiscente se produce en presencia de un potenciador secundario seleccionado entre la clase química de los N-azoles y en el que el potenciador primario es 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio.

Los potenciadores secundarios de la presente invención incluyen, en particular, los siguientes N-azoles: imidazol, 1-metilimidazol, 1,2,3-triazol y 1,2,4-triazol.

Un N-azol se define como una clase de compuestos de anillo heteroaromático de nitrógeno de cinco elementos que contienen al menos otro átomo de nitrógeno (no de carbono).

Aunque la presente invención se refiere al uso, en general, y a cualquier fin de los azoles para aumentar y regular la emisión de luz producida mediante la reacción quimioluminiscente, realmente se puede aplicar principalmente en el contexto de una prueba.

El término "prueba" significa la detección, semicuantificación o cuantificación de un analito.

Típicamente, la implementación de una prueba requiere relacionar la emisión de luz con la cantidad de peróxido usado, de manera que la peroxidasa es la sustancia determinada directamente. Aunque la presente invención resulta útil para la determinación de la presencia o la cantidad de cualquiera de las parejas de reacción (luminol; peroxidasa; oxidante; mediador de electrones; N-azol como potenciador secundario), la pareja de reacción no es necesariamente la propia sustancia que se va a determinar. Por ejemplo, el oxidante puede producirse mediante una reacción previa, o un conjunto de reacciones previas.

La peroxidasa o el luminol pueden estar presentes en la forma de un conjugado con un ligando capaz de enlazar el analito de interés, como, por ejemplo, un anticuerpo usado en una prueba inmunoenzimática para determinar un antígeno, o un antígeno para determinar un anticuerpo. Sin embargo, la peroxidasa puede conjugarse para dar un nucleótido, un oligonucleótido o un ácido nucleico en los ensayos de hibridación. Por lo tanto, la presente invención se puede aplicar a cualquier procedimiento de prueba de diagnóstico de un analito, cuya presencia o cantidad se refiere a la presencia o cantidad de una pareja de reacción seleccionada entre el grupo que consiste en luminol, una enzima peroxidasa, un oxidante, un potenciador primario, un N-azol como potenciador secundario, que reaccionan en conjunto en una reacción quimioluminiscente, cuya emisión de luz se detecta o mide de manera que la presencia o la cantidad del analito que se va a analizar se refiere a la producción de luz. La presente invención también incluye un kit para la realización de una prueba que comprende luminol, un oxidante, un mediador de electrones como potenciador primario y un azol como potenciador secundario, en el que el potenciador primario es 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio. El kit también puede comprender adicionalmente una enzima peroxidasa, opcionalmente marcada o adecuada para marcarse en un ligando específico para el analito que se va a someter a prueba.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, se describirá la invención, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras de dibujo adjuntas, en las que:

la Figura 1 muestra un gráfico de la señal quimioluminiscente (valor inicial y desvanecimiento de señal en porcentaje después de un período de 900 segundos) como una función del pH con imidazol como potenciador secundario.

La Figura 2 muestra un gráfico de la señal quimioluminiscente (valor inicial y desvanecimiento de señal en porcentaje después de un período de 900 segundos) como una función del pH con 1-metilimidazol como potenciador secundario.

La Figura 3 muestra un gráfico de la señal quimioluminiscente (valor inicial y desvanecimiento de señal en porcentaje después de un período de 900 segundos) como una función del pH con 1,2,4-triazol como potenciador secundario.

La Figura 4 muestra un gráfico de la señal quimioluminiscente como una función de la concentración de diversos potenciadores secundarios (MORP, imidazol, 1-metilimidazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol).

Descripción detallada de la invención

Los potenciadores secundarios de la presente invención incluyen, en particular, los siguientes N-azoles: imidazol, 1-metilimidazol, 1,2,3-triazol y 1,2,4-triazol. Estos compuestos resultan particularmente útiles en las pruebas quimioluminiscentes que requieren un nivel alto y constante de emisión de luz, tales como las pruebas de transferencia, incluyendo las transferencias Western, de Southern y Northern, así como las transferencias puntuales y las pruebas de hibridación de ácidos nucleicos.

Se sabe bien que el imidazol es un catalizador para la quimioluminiscencia con peroxioxalato (T. Jonsson y K. Irgum, Anal. Chim. Acta 1999; 400:257-264; T. Jonsson y K. Irgum, Anal. Chem. 2000; 72:1373-1380). Sin embargo, los sistemas descritos anteriormente no son comparables a aquellos que son objeto de la presente invención. Por tanto, se asignan a diferentes clases, tal como se ilustra en K.D. Gundermann y F. McCapra, en "Chemiluminescence in Organic Chemistry", Springer 1987, en concreto, la Clase IV (quimioluminiscencia con peroxalato) frente a la Clase V (luminol y compuestos relacionados). En particular, se sabe que determinados oxalatos orgánicos reaccionan con peróxido de hidrógeno para producir peroxioxalatos inestables, que se descomponen inmediatamente para dar CO₂. Se añade un fluoróforo a la mezcla, capaz de someterse a una quimioluminiscencia por intercambio de electrones iniciada por productos químicos. Los catalizadores de acilación, tales como el imidazol o la 4-dimetilaminopiridina, se sabe que catalizan la formación de los peroxalatos, aumentando de ese modo la emisión de luz. Estas reacciones se producen en un disolvente aprótico, tal como el acetonitrilo, y son muy rápidas, terminando en cuestión de segundos. Claramente, estas no son especialmente adecuadas para el desarrollo de pruebas inmunoenzimáticas.

La concentración del potenciador de N-azol se encuentra, generalmente, en el intervalo entre 0,001 y 200 mmol/litro, preferentemente entre 0,1 mmol y 50 mmol/litro. En particular, la concentración del imidazol se encuentra, generalmente, en el intervalo entre 0,1 mmol y 50 mmol/litro.

En todos los casos, la dependencia del pH de la emisión de luz inicial sigue una curva en forma de campana. Los mejores resultados en términos de emisión de luz inicial se obtienen, generalmente, en un pH inferior a 9,1; en particular, los mejores resultados se obtienen en el intervalo de pH entre 8,3 y 8,6 para el imidazol y el 1-metilimidazol, en la Figura 1 y 2, mientras que para el 1,2,4-triazol, los desplazamientos óptimos se obtienen a mayor intervalo de pH, preferentemente entre 8,6 y 9,3, en la Figura 3.

Por otra parte, la estabilidad de la señal de luz, calculada como la disminución en porcentaje de la señal de luz inicial después de 15 minutos, sigue una curva en forma de sigmoide en todos los casos. El punto de inflexión de los sigmoides se produce en aproximadamente el mismo valor de pH que el valor máximo de la señal inicial.

Un gráfico que muestra la dependencia de la emisión de luz inicial con la concentración del potenciador secundario se muestra en la Figura 4. En contraste con el aumento muy brusco en la emisión de luz observada incluso para concentraciones muy bajas de 4-morfolinopiridina (MORP), un catalizador de 4-aminopiridina típico, el aumento en la intensidad de señal es mucho más gradual cuando se emplean N-azoles como potenciadores secundarios. Además, mientras la MORP alcanza un efecto máximo en la concentración de 6 mM y, después, disminuye bruscamente su efecto de potenciación con un aumento adicional en la concentración, los N-azoles o bien comienzan a disminuir lentamente su acción en una concentración muy alta, por ejemplo, el imidazol, o bien tienden a alcanzar un nivel estable (1-metilimidazol, 1,2,4-triazol y 1,2,3-triazol).

Resulta evidente, a partir de estos datos, que el uso de potenciadores secundarios basados en N-azoles permite un grado mucho más alto de control sobre la reacción quimioluminiscente, en comparación con la clase de 4-aminopiridinas previamente conocida. Por tanto, resulta posible, a través del uso de N-azoles, regular firmemente tanto la señal de luz inicial como su duración. Esta característica es muy valiosa, ya que permite la preparación de sustratos de HRP quimioluminiscentes ajustados finamente para un uso específico. Por ejemplo, puede resultar útil la obtención de un efecto de potenciación más moderado, junto con una duración de señal más larga, para maximizar la cantidad total de luz producida en una ventana de exposición dada. Por tanto, resulta posible la

optimización de un sustrato quimioluminiscente según el procedimiento de detección de luz, por ejemplo, las películas frente a los dispositivos electrónicos, tales como los dispositivos acoplados de carga (CCD), que tienen características incompatibles.

- 5 En cuanto al mecanismo de reacción responsable del efecto observado de los potenciadores secundarios de N-azol, este puede ser algo similar al sugerido para las 4-aminopiridinas, por ejemplo, un ataque nucleófilo sobre la diazaquinona, L, con la producción de un producto intermedio más reactivo hacia el peróxido de hidrógeno. Las diferencias entre los N-azoles y las 4-aminopiridinas pueden ser atribuibles a sus diferentes nucleofilicidades.

En cuanto a los otros componentes de los sustratos enzimáticos de la presente invención, se pueden aplicar las siguientes especificaciones.

- 10 El luminol usado debe ser de una pureza adecuada y apropiada para las pruebas de luminiscencia. El luminol puede usarse como la sal de sodio. La concentración del luminol en el sustrato quimioluminiscente se encuentra, generalmente, entre 0,1 mmol/litro y 50 mmol/litro, preferentemente entre 0,5 y 10 mmol/litro.

- 15 El oxidante puede ser cualquier sustancia capaz de oxidar el luminol con la producción de luz. Se prefiere una fuente de peróxido, tal como el peróxido de hidrógeno o el perborato de sodio. La concentración del oxidante en el sustrato quimioluminiscente se encuentra entre 0,1 y 100 mmol/litro, preferentemente entre 0,5 y 10 mmol/litro.

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

- 25 La enzima peroxidasa es cualquier peroxidasa adecuada para su uso en las pruebas de luminiscencia. En particular, esta puede ser peroxidasa de rábano picante, por ejemplo, de tipo VI A o IX de Sigma. Esta también puede ser una peroxidasa aniónica, por ejemplo, peroxidasa de soja o peroxidasa de patata dulce. La peroxidasa puede estar libre o conjugada con un ligando, o un biopolímero, o una fase sólida.

- 30 Las reacciones quimioluminiscentes de la presente invención se pueden aplicar en la detección y la cuantificación de los analitos, usando, por ejemplo, la formación de un enlace entre una proteína o un ácido nucleico y una membrana y una peroxidasa como indicador. La reacción luminiscente se inicia mediante la adición del sustrato quimioluminiscente a la membrana. La emisión de luz se prolonga y puede medirse mediante una película, una cámara u otro instrumento.

- 35 El sustrato quimioluminiscente, compuesto de luminol, una fuente de peróxido (el oxidante), un potenciador primario y un N-azol como potenciador secundario, puede prepararse de manera conveniente en una forma de kit, tal como se conoce en la técnica. En particular, el luminol y el peróxido se formulan mejor como soluciones separadas (viales), por ejemplo, A y B, para prolongar su vida útil. Los potenciadores primario y secundario, así como otros aditivos, tales como los quelantes y los estabilizantes, pueden añadirse a las soluciones/los viales ya sean de luminol o de peróxido, o a ambos. Las dos soluciones de kit también contienen sustancias tamponadoras y se formulan de tal manera que, tras el mezclado, el sustrato quimioluminiscente, o "solución de trabajo", alcanza un valor de pH óptimo. La enzima peroxidasa no se almacena junto con su componente de sustrato, sino como un ingrediente separado, normalmente como un conjugado con el ligando para la sustancia/el analito de interés, y también puede ser realizado por el usuario final.

- 45 Las pruebas quimioluminiscentes basadas en la solución de sustrato de la presente invención incluyen pruebas de transferencia Western y transferencia puntual para las proteínas y pruebas de transferencias de Southern y Northern para los ácidos nucleicos. Las pruebas de transferencia usan electroforesis en gel para separar el analito de interés (una proteína o molécula de ácido nucleico) de los otros componentes (otras proteínas u otras moléculas de ácido nucleico) presentes en la muestra que se va a someter a ensayo. El analito y los otros componentes se transfieren después a una membrana, en la que estos se sondan (se detectan) usando un ligando (sondas de oligonucleótidos o anticuerpos) específico para el analito.

- 50 Otra aplicación importante de los sustratos quimioluminiscentes de la presente invención es en las pruebas inmunoenzimáticas ELISA, especialmente para los analitos presentes en cantidades extremadamente pequeñas, tales como los marcadores tumorales, hormonas tiroideas, virus proteicos (VIH, VHC, VPH) u hormonas esteroideas (estradiol, aldosterona). En la realización de una prueba ELISA para la detección de un analito, la prueba implica al menos un ligando (agente de detección) con especificidad para el analito de interés. El analito dentro de la muestra se inmoviliza sobre un soporte sólido (normalmente una placa de microtitulación de poliestireno), ya sea de manera no específica (mediante la adsorción a la superficie) o de manera específica (mediante la captura por otro ligando específico para el mismo analito, en una ELISA de "sándwich"). Después de inmovilizarse el analito, se añade el

agente de detección, que forma un complejo con el analito. El agente de detección puede unirse de manera covalente a una enzima peroxidasa o puede detectarse por sí solo mediante un agente de detección secundario que se une a una enzima peroxidasa a través de bioconjugación (como, por ejemplo, mediante biotina o estreptavidina). Entre cada etapa, la placa se lava típicamente con una solución de detergente moderada para retirar cualquier proteína o anticuerpo que no esté específicamente enlazado. Después de la etapa de lavado final, se desarrolla la placa mediante la adición del sustrato enzimático (el sustrato quimioluminiscente descrito en el presente documento) para producir una señal de luz, que indica la cantidad de analito en la muestra.

Ejemplos

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

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

Todos los reactivos usados dentro de la presente solicitud se adquirieron a través de Sigma-Aldrich.

Todas las mediciones indicadas en los Ejemplos se llevaron a cabo con un espectrofluorímetro Varian Eclipse y los siguientes parámetros: modo de bio/quimioluminiscencia; longitud de onda de emisión: 425 nm; rendija de emisión: 20 nm; tensión de detección de fotomultiplicador: media.

Ejemplo 1

Dependencia de pH del imidazol sobre la reacción de luminol-peróxido-3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio-peroxidasa

Se preparó un sustrato quimioluminiscente con la siguiente composición:

[sal de sodio de luminol] = 5 mM
 [perborato de sodio] = 4 mM
 [3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio] = 3 mM [imidazol] = 10 mM
 En un tampón de Tris 0,15 mM de pH 9,0

Se prepara un conjunto de cubetas de polimetilmetacrilato desechables, conteniendo cada una 2 ml de la solución de sustrato. En cada cubeta se añaden cantidades pequeñas de HCl 5 M o NaOH 5 M, con el fin de ajustar el pH en el intervalo de 8,0-10,0, sin producir, en ningún caso, cambios significativos en el volumen total. En cada cubeta se añaden 10 µl de una solución de peroxidasa de rábano picante de 2 µg/ml (HRP tipo VIA) y, simultáneamente, se inicia una cuenta atrás de 30 segundos. La cubeta se cierra con una pieza cuadrada de parafilm y se agita en vórtice durante 3 segundos. La cubeta se introduce después en el espectrofluorímetro. Al final de la cuenta atrás de 30 segundos, se inicia y registra la medición de la señal luminiscente durante un período de 900 segundos. En todos los casos, la señal alcanza un nivel estable dentro de los 30 segundos después de la adición de la peroxidasa y, después, empieza a disminuir lentamente. Los niveles de señal iniciales, así como el % de descenso de señal durante los primeros 900 min, se representan frente al pH, en la Figura 1.

Ejemplo 2

Dependencia de pH del 1-metilimidazol sobre la reacción de luminol-peróxido-3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio-peroxidasa

Se preparó un sustrato quimioluminiscente con la siguiente composición:

[sal de sodio de luminol] = 5 mM
 [perborato de sodio] = 4 mM
 [3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio] = 3 mM [1-metilimidazol] = 10 mM
 En un tampón de Tris 0,15 mM de pH 9,0

Se usa el mismo procedimiento experimental que el descrito en el Ejemplo 2. Los niveles de señal iniciales, así como el % de descenso de señal durante los primeros 900 min, se representan frente al pH, en la Figura 2.

Ejemplo 3

Dependencia de pH del 1,2,4-triazol sobre la reacción de luminol-peróxido-3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio-peroxidasa

Se preparó un sustrato quimioluminiscente con la siguiente composición:

[sal de sodio de luminol] = 5 mM

[perborato de sodio] = 4 mM
 [3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio] = 3 mM [1,2,4-triazol] = 10 mM
 En un tampón de Tris 0,15 mM de pH 9,0

Se usa el mismo procedimiento experimental que el descrito en el Ejemplo 2. Las señales iniciales, así como el % de descenso de señal durante los primeros 900 min, se representan frente al pH, en la Figura 3.

Ejemplo 4

Dependencia de la reacción luminol-peróxido-peroxidasa potenciada con 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio sobre la concentración del potenciador secundario

Se prepara un conjunto de sustratos quimioluminiscentes en un tampón de Tris 0,15 M, de pH 9,00 $\pm$ 0,05, con las siguientes composiciones:

[sal de sodio de luminol] = 5 mM
 [perborato de sodio] = 4 mM
 [3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio] = 3 mM segundo potenciador = MORP, imidazol, 1-metilimidazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol en las siguientes concentraciones:

[MORP] = 0,025 mM, 0,05 mM, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1,5 mM, 3 mM, 5 mM, 6,5 mM, 8 mM, 10 mM.
 [imidazol] = 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 35 mM, 45 mM, 75 mM.
 [1-metilimidazol] = 1,5 mM, 3 mM, 5 mM, 15 mM, 25 mM, 35 mM, 45 mM, 75 mM.
 [1,2,3-triazol] = 3 mM, 25 mM, 55 mM, 85 mM.
 [1,2,4-triazol] = 1,5 mM, 3 mM, 5 mM, 25 mM, 45 mM, 55 mM, 75 mM, 85 mM.

Se prepara un conjunto de cubetas de polimetilmetacrilato desechables, conteniendo cada una 2 ml de la solución de sustrato. En cada cubeta se añaden 10 μ l de una solución de peroxidasa de rábano picante de 2 μ g/ml (HRP tipo VIA) y, simultáneamente, se inicia una cuenta atrás de 30 segundos. La cubeta se cierra con una pieza cuadrada de parafilm y se agita en vórtice durante 3 segundos. La cubeta se introduce después en el espectrofluorímetro. Al final de la cuenta atrás de 30 segundos, se inicia y registra la medición de la señal luminiscente durante un período de 900 segundos. En todos los casos, la señal alcanza un nivel estable dentro de los 30 segundos después de la adición de la peroxidasa y, después, empieza a disminuir lentamente. Los niveles estables iniciales se representan frente a la concentración del potenciador secundario, en la Figura 4. Tal como puede observarse, el efecto de la MORP sobre la intensidad de señal es bastante fuerte incluso en concentraciones muy bajas. La emisión de señal alcanza un máximo brusco en aproximadamente 1,5 mM de MORP y, después, desciende abruptamente. Por el contrario, los N-azoles ejercen un efecto mucho más gradual sobre la intensidad de señal, alcanzando un nivel estable en niveles de concentración mucho más altos. Por tanto, estos permiten un grado considerable de regulación de la emisión de luz quimioluminiscente, que no puede obtenerse con potenciadores secundarios de dialquilaminopiridina, tales como la MORP.

Ejemplo 5

Sustratos para la medición de la peroxidasa por quimioluminiscencia

Para garantizar una estabilidad a largo plazo, los componentes del sustrato quimioluminiscente pueden proporcionarse como soluciones separadas, que, cuando se necesitan, pueden mezclarse para producir una solución de trabajo. Por ejemplo, una solución de trabajo para la medición de la peroxidasa puede obtenerse mediante el mezclado de partes iguales de las siguientes soluciones:

Sustrato (1):

Solución A:

[sal de sodio de luminol] = 2 mM
 [3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio] = 0,3 mM
 [imidazol] = 0,25 mM
 En un tampón de Tris 0,10 mM de pH 9,6

Solución B:

[perborato de sodio] = 8 mM
 En un tampón de acetato 50 mM de pH 5,0

El pH de la solución de trabajo, después del mezclado de la Solución A y B, es de 9,0.

Sustrato (2):

Solución A:

[sal de sodio de luminol] = 10 mM
 [3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio] = 1,5 mM
 [imidazol] = 1,0 mM
 En un tampón de Tris 0,25 mM de pH 9,6

5 Solución B:

[perborato de sodio] = 8 mM
 En un tampón de acetato 50 mM de pH 5,0

El pH de la solución de trabajo, después del mezclado de la Solución A y B, es de 9,0.

Sustrato (3):

10 Solución A:

[sal de sodio de luminol] = 10 mM
 [3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio] = 6 mM
 [imidazol] = 40 mM
 En un tampón de Tris 0,30 mM de pH 9,3

15 Solución B:

[perborato de sodio] = 8 mM
 En un tampón de acetato 50 mM de pH 5,0

El pH de la solución de trabajo, después del mezclado de la Solución A y B, es de 8,6.

Ejemplo 6

20 Prueba de transferencia Western de Akt total

El procedimiento de transferencia usado se describe en H. Towbin y col. en Proc. Acad. Sci. 76, 4350-4353 (1979). Las diluciones en serie de lisados de células C2C12 se separaron mediante electroforesis en gel sobre gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 12 %. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para la transferencia Western. Los sitios de enlace no específicos se bloquearon con una solución de polvo de leche al 5 % durante 1 hora y, después, se lavaron varias veces con un tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 137 mM). A continuación, se incubaron las transferencias con anti-Akt total de conejo en dilución de 1:20.000 durante una hora, después, se lavaron tal como se hizo 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 (anti-conejo de cabra, en dilución de 1:100.000). Se preparó una solución de trabajo, según el Ejemplo 5, el Sustrato (2). A continuación, se añadió la solución de trabajo a la membrana y se incubó durante cinco minutos. Se adquirió la señal quimioluminiscente usando una película autoradiográfica con una exposición de 1 minuto. Las imágenes autoradiográficas se escanearon y digitalizaron. Los resultados fueron comparables a aquellos obtenidos usando un sustrato quimioluminiscente comercial (SuperSignal Dura, ThermoScientific).

Ejemplo 7

35 Prueba ELISA de tiroglobulina humana

Esta prueba inmunométrica se basa en la reacción inmunoquímica entre un anticuerpo de captura, un antígeno (tiroglobulina humana, Tg) y un anticuerpo marcado con peroxidasa de soja (SbP). Se prepararon pocillos con anticuerpo de captura mediante la incubación de las placas de micropocillos revestidas con estreptavidina con una solución de anticuerpo de captura biotinilado. A continuación, se incubaron los pocillos con calibradores de Tg a partir de un kit comercial. Después de un período de incubación de una hora a 37 °C, se lavó la placa con PBS-Tween-20 al 0,05 %. A continuación, se añadieron a cada pocillo 200 µl de una solución de un anticuerpo anti-Tg marcado con peroxidasa. Los pocillos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y, después, se lavaron para retirar el exceso de conjugado. Una solución de trabajo quimioluminiscente preparada tal como se describe en el Ejemplo 5, el Sustrato 3, se añadió a los pocillos y se incubó durante diez minutos. Se obtuvo un límite de detección inferior (LOD) para Tg de 0,2 ng/ml. Este valor fue idéntico al LOD obtenido con un kit comercial basado en el sistema de detección de dioxetano/fosfatasa alcalina.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aumentar y regular la emisión de luz en términos de señal de luz inicial y duración de señal de luz producida mediante la reacción quimioluminiscente del luminol, una enzima peroxidasa, un oxidante y un potenciador primario, en el que dicha reacción quimioluminiscente se produce en presencia de un potenciador secundario, en el que dicho potenciador secundario se selecciona entre la clase química de N-azoles y en el que el potenciador primario es 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho potenciador secundario se selecciona entre imidazol, 1-metilimidazol, 1,2,3-triazol y 1,2,4-triazol.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha enzima peroxidasa se selecciona entre peroxidasa de rábano picante, peroxidasa de soja y peroxidasa de patata dulce.
4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha peroxidasa está libre o conjugada con un ligando.
5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho oxidante se selecciona entre perborato de sodio y peróxido de hidrógeno.
6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha reacción quimioluminiscente se lleva a cabo en un pH entre 8,0 y 10,0, preferentemente de 8,3 a 9,3.
7. Un procedimiento para realizar una prueba de transferencia de un analito en una muestra, en el que dicho procedimiento emplea un procedimiento para aumentar y regular la emisión de luz producida mediante la reacción quimioluminiscente del luminol según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como medio de detección y cuantificación de dicho analito.
8. Un procedimiento para realizar una prueba ELISA de un analito en una muestra, en el que dicho procedimiento emplea un procedimiento para aumentar y regular la emisión de luz producida mediante la reacción quimioluminiscente del luminol según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como medio de detección y cuantificación de dicho analito.
9. Kit para realizar una prueba para determinar un analito en una muestra, en el que el kit comprende luminol, un oxidante, un potenciador primario en forma de un mediador de electrones, en el que dicho potenciador primario es 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio y un potenciador secundario en forma de un N-azol.
10. Kit según la reivindicación 9, en el que el luminol está presente en un primer vial y el oxidante está presente en un segundo vial y en el que el potenciador primario y el potenciador secundario están presentes ya sea en el primer vial o en el segundo vial o en ambos viales.
11. Kit según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el kit comprende adicionalmente una enzima peroxidasa.
12. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el luminol o la enzima peroxidasa se conjugan o son adecuados para conjugarse con un ligando capaz de enlazar el analito.
13. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que dicho potenciador secundario se selecciona entre imidazol, 1-metilimidazol, 1,2,3-triazol y 1,2,4-triazol.
14. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicha enzima peroxidasa se selecciona entre peroxidasa de rábano picante, peroxidasa de soja y peroxidasa de patata dulce.
15. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que dicho oxidante se selecciona entre perborato de sodio y peróxido de hidrógeno.

FIG. 1

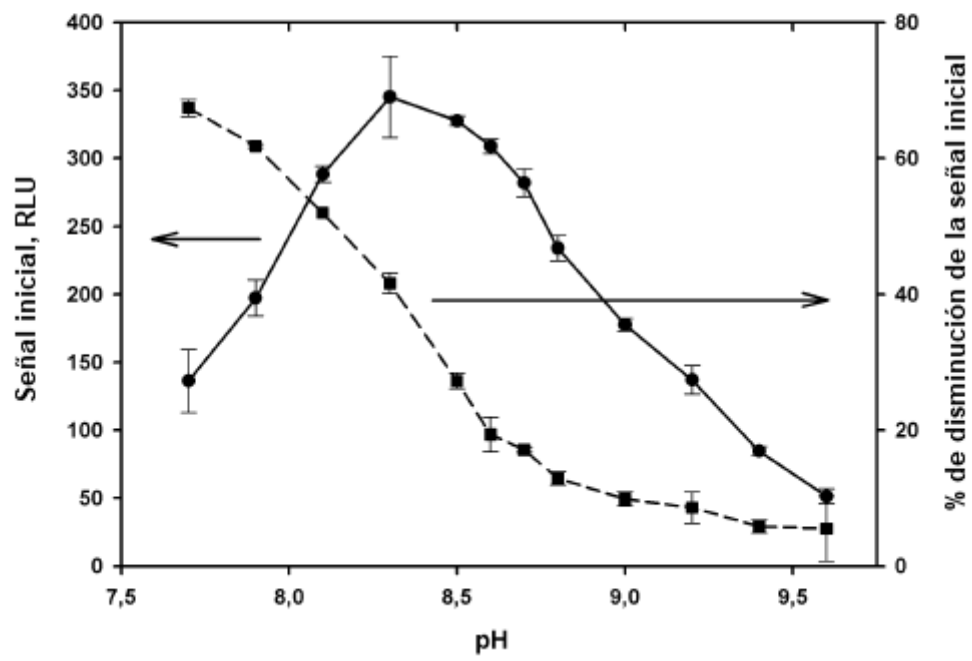


FIG. 2

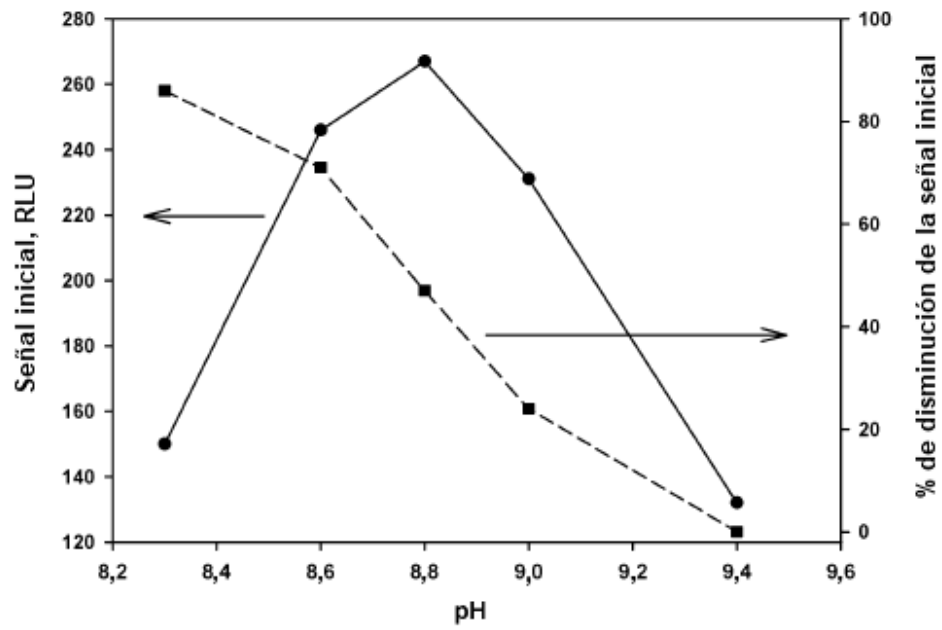


FIG. 3

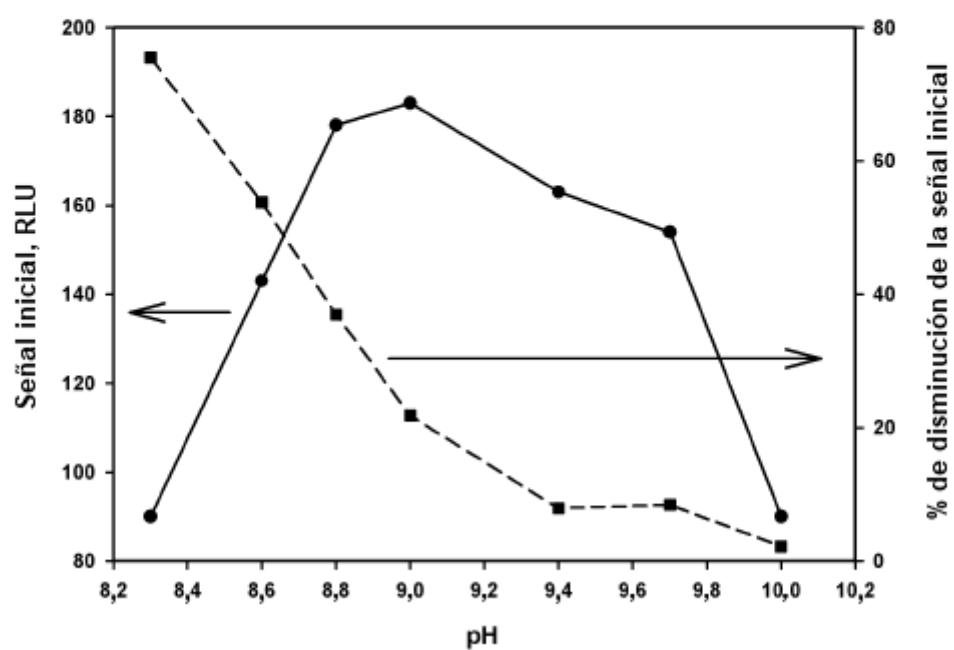


FIG. 4

