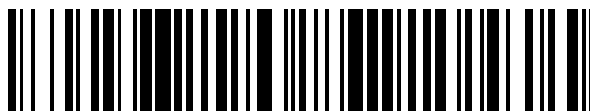


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 098**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/28 (2006.01)

G01N 21/25 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2012 E 17197044 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3296405**

54 Título: **Método y kit para medición de superalta sensibilidad de proteína y ácido nucleico, y nuevo sustrato enzimático**

30 Prioridad:

23.03.2011 JP 2011063559

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

22.05.2020

73 Titular/es:

**ITO, ETSURO (25.0%)
1-15-102, Nishi 14-chome, Minami 19-jou, Chuo-ku
Sapporo-shi, Hokkaido 064-0919, JP;
WATABE, SATOSHI (25.0%);
MIURA, TOSHIAKI (25.0%) y
YOSHIMURA, TERUKI (25.0%)**

72 Inventor/es:

ITO, ETSURO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 762 098 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

Método y kit para medición de superalta sensibilidad de proteína y ácido nucleico, y nuevo sustrato enzimático

5 [Referencia cruzada a solicitudes de patente relacionadas]

La presente solicitud reivindica la prioridad en la solicitud de patente japonesa 2011-63559, presentada el 23 de marzo de 2011.

10 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un ensayo de alta sensibilidad de proteína y ácido nucleico y a un kit que usa un inmunoensayo enzimático y un ensayo de sonda de ácido nucleico. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método que permite un ensayo de ultraalta sensibilidad de proteína o ácido nucleico mientras que evita la interferencia causada en el método del ciclo de tio-NAD usado en estos ensayos de actividad enzimática mediante el empleo de un sustrato enzimático específico para una enzima marcada para un anticuerpo o sonda de ácido nucleico. La presente invención también se refiere a nuevos sustratos enzimáticos que se pueden usar en el ensayo de alta sensibilidad anterior de proteína y ácido nucleico y a un kit.

20 [Antecedentes en la tecnología]

Aunque se establece técnicamente el método de radioinmunoensayo (RIA) como una medición de alta sensibilidad de proteína o ácido nucleico, en las presentes circunstancias, es imposible cambiar el método mencionado anteriormente por uno que tenga una alta sensibilidad más allá de un grado de 10^{-16} moles además de mejorar la sensibilidad del equipo de detección. Y mediante el método de RIA, no solo se limita el lugar de la medición a una instalación experimental de isótopos, sino que la fecha de caducidad de los reactivos se volverá extremadamente corta y la sensibilidad de los reactivos disminuirá rápidamente, a causa del uso de nucleidos de vida corta. También tiene el problema del problema de los residuos radiactivos para el método de medición de radiación. Especialmente el problema del abandono en el caso de usar un nucleido de larga duración es serio. Por lo tanto, recientemente la investigación y desarrollo de la medición de alta sensibilidad de proteína o ácido nucleico se han desarrollado considerando "no radiactivo" como palabra clave. De ese modo, la mayoría de la investigación y desarrollo y la mejora técnica del método de RIA no se realizan en las condiciones actuales.

Una medición de alta sensibilidad reemplazada con el método de RIA, que es el inmunoensayo enzimático (método de ELISA) en la medición de proteína (Figura 1), y el método de PCR en la medición de ácido nucleico. El inmunoensayo enzimático puede transcurrir con elevada sensibilidad (10^{-15} moles) mediante el método de fluorescencia y el método de luz emitida de sensibilidad de 10^{-13} moles mediante el ensayo colorimétrico en el revelado inicial, y también transcurre en el desarrollo y la mejora de dispositivo de medición exclusivo. Sin embargo, la sensibilidad ha llegado al límite, pero la operación de la medición es sencilla.

Además, en el método de PCR de medición de alta sensibilidad de ácido nucleico, se considera el problema de la detección de señal específica para la molécula diana, la eficacia de amplificación y las condiciones del producto de PCR llegando a una meseta, la cuantificación de ácido nucleico es estrictamente difícil.

El inmunoensayo enzimático que usa complejo anticuerpo-enzima y el ensayo de sonda de ácido nucleico que usa un complejo ácido nucleico-enzima que usa un ensayo de ciclo de tio-NAD ya se conoce (véase el documento WO2008/117816). Además, Sigma-Aldrich ofrece una enzima de peroxidasa de rábano y, como ensayo de control de calidad, un ensayo enzimático para dicha peroxidasa que usa ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) como sustrato. En Atsushi Iway y col., Kagakukeigaku Kyokai Hokkaido Shibu 2010 nen toki Kenkyu Happyokai koen yosh, 26 de enero de 2010, página 65 a, se describe un ensayo que usa una enzima de galactosidasa y un derivado de androsterona. Asimismo, en Kishi K. y col., Chlinical Chemistry, am. Ass. For chlinical chemistry, vol. 48, n.º 5, 1 de enero de 2002, páginas 737-741, se describe un ensayo que usa colesterol oxidasa, peroxidasa y un sustrato cromogénico.

55 [Divulgación de la invención]**[Problemas a solucionar mediante la invención]**

De acuerdo con el método del Documento de patente 1, el inmunoensayo enzimático se combinó con el método de ciclo enzimático que usa como sustrato el que se produce mediante la enzima de marcaje que usa el inmunoensayo enzimático, y tio-NAD(P)H como sustancia de señal se amplifica de forma progresiva geométrica, y mediante un método de ensayo colorimétrico, da como resultado la cuantificación de proteína o ácido nucleico y la detección mediante ácido nucleico. Sin embargo, reveló que no necesariamente elevada reactividad de la enzima marcada y el sustrato, y el sustrato de la enzima de ciclo marcada inhibe parcialmente la reacción enzimática en la reacción de ciclo enzimático.

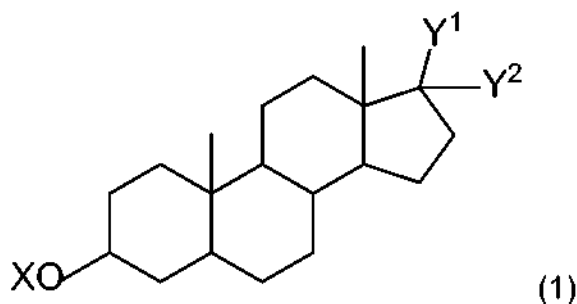
El objetivo de la presente invención está en un inmunoensayo enzimático, combinándose el método con el método de ciclo que usa como sustrato el que se produce mediante la enzima marcada usada en el inmunoensayo enzimático, solucionando el problema mencionado anteriormente del sustrato para la enzima marcada, y usando un medio de ensayo colorimétrico, método de detección de elevada sensibilidad de proteína o ácido nucleico mediante ensayo colorimétrico del método más fácil, y proporcionando el ensayo de aumento de la sensibilidad hasta un grado progresivo geométrico. En particular, se proporciona el método de ensayo que aumentó la sensibilidad más de 10^{18} moles.

El presente inventor ha tenido éxito en la obtención de un compuesto como sustrato para enzima marcada que soluciona el problema mencionado anteriormente o que proporciona el nuevo compuesto y, por lo tanto, usando estos sustratos, ha tenido éxito en solucionar el problema mencionado anteriormente, y de ese modo se ha completado la presente invención.

[Medios para solucionar los problemas]

La presente invención es como sigue a continuación:

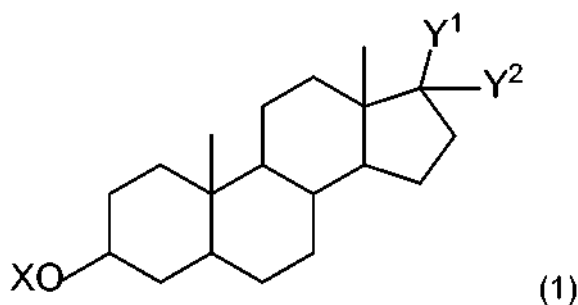
[1] Un método para someter a ensayo la actividad enzimática usando un complejo anticuerpo-enzima, en el que se usa peroxidasa como enzima del complejo anticuerpo-enzima, y se usa un derivado de androsterona representado por la siguiente fórmula (1) como sustrato de la enzima,



en la que

(iii) X representa $-O-CO-R$ (siempre que R represente un grupo alquilo C_{1-6} o un grupo fenilo), Y^1 e Y^2 representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y^1 representa hidrógeno, e Y^2 representa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_{1-6} , o un grupo alquilo C_{1-6} cuando se usa el derivado de androsterona representado por la fórmula (1) como sustrato de peroxidasa, y la cuantificación de un producto de la reacción enzimática se lleva a cabo mediante la producción de tio-NADH y/o tio-NADPH por reacción de ciclo enzimático usando NADH y/o NADPH, tio-NAD y/o tio-NADP, e hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD), y sometiendo a ensayo la cantidad del tio-NADH y/o tio-NADPH producido, o midiendo el cambio del color por el tio-NADH y/o tio-NADPH producido.

[2] Un método para someter a ensayo una sonda de ácido nucleico usando una sonda de ácido nucleico marcada con enzima, en el que se usa peroxidasa como enzima de la sonda de ácido nucleico marcada con enzima, y se usa un derivado de androsterona representado por la siguiente fórmula (1) como sustrato de la enzima,



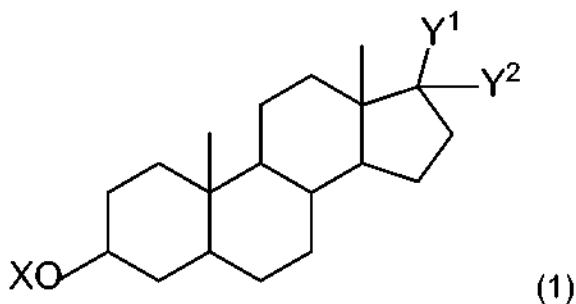
en la que

(iii) X representa $-O-CO-R$ (siempre que R represente un grupo alquilo C_{1-6} o un grupo fenilo), Y^1 e Y^2 representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y^1 representa hidrógeno, e Y^2 representa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C_{1-6} , o un grupo alquilo C_{1-6} cuando se usa el derivado de androsterona

representado por la fórmula (1) como sustrato de peroxidasa, y la cuantificación de un producto de reacción de la reacción enzimática se lleva a cabo mediante la producción de tio-NADH y/o tio-NADPH por reacción de ciclo enzimático usando NADH y/o NADPH, tio-NAD y/o tio-NADP, e hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD), y sometiendo a ensayo la cantidad del tio-NADH y/o tio-NADPH producido, o midiendo el cambio del color por el tio-NADH y/o tio-NADPH producido.

[3] Un kit para inmunoensayo enzimático que comprende los siguientes reactivos (1) a (5):

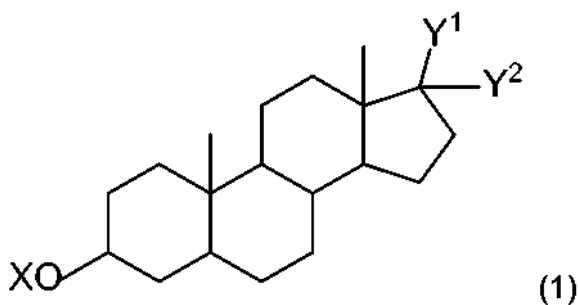
- (1) peroxidasa marcada con un anticuerpo específico frente a un antígeno de la proteína diana,
- (2) un derivado de androsterona representado por la fórmula (1), que es un sustrato de la enzima descrita anteriormente



- (en la que X representa -O-CO-R (siempre que R represente un grupo alquilo C₁₋₆ o un grupo fenilo), Y¹ e Y² representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y¹ representa hidrógeno, e Y² representa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁₋₆, o un grupo alquilo C₁₋₆),
- (3) hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD),
- (4) NADH y/o NADPH, y
- (5) tio-NAD y/o tio-NADP.

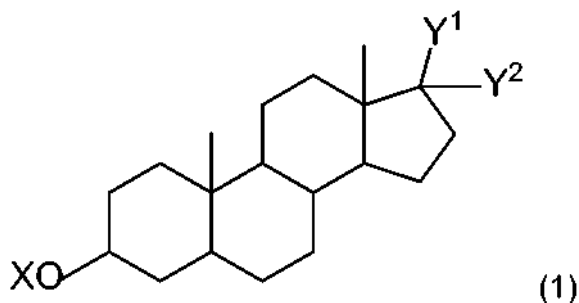
[4] Un kit para someter a ensayo una sonda de ácido nucleico que comprende los siguientes reactivos (1) a (5):

- (1) peroxidasa marcada con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico diana,
- (2) un derivado de androsterona representado por la fórmula (1), que es un sustrato de la enzima descrita anteriormente



- (en la que X representa -O-CO-R (siempre que R represente un grupo alquilo C₁₋₆ o un grupo fenilo), Y¹ e Y² representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y¹ representa hidrógeno, e Y² representa un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁₋₆, o un grupo alquilo C₁₋₆),
- (3) hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD),
- (4) NADH y/o NADPH, y
- (5) tio-NAD y/o tio-NADP.

[5] Un derivado de androsterona representado por la siguiente fórmula (1):



5 en la que,
X representa -O-CO-R, R representa un grupo alquilo C₁₋₆ o un grupo fenilo, e Y¹ e Y² representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y¹ representa hidrógeno, e Y² representa un hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁₋₆ o un grupo alquilo C₁₋₆.

10 [Efectos de la invención]

De acuerdo con la presente invención, es posible proporcionar un inmunoensayo enzimático que mejora la sensibilidad del ensayo hasta 10⁻¹⁸ moles o más, y medir una proteína diana o ácido nucleico diana con elevada sensibilidad.

15

[Breve descripción de las figuras]

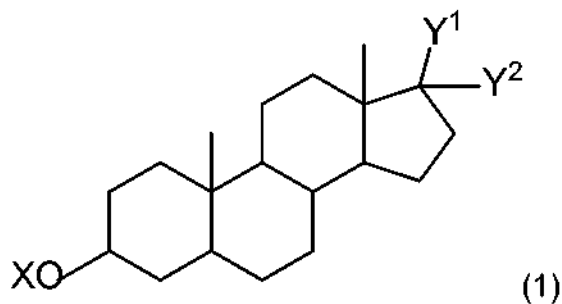
La Figura 1 es el principio de ensayo del inmunoensayo enzimático (método ELISA);
 20 la Figura 2 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo Comparativo 1;
 la Figura 3 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo Comparativo 2;
 la Figura 4 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo Comparativo 3;
 la Figura 5 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo Comparativo 4;
 la Figura 6 son compuestos de ejemplo de algunos 3 α -hidroxiandrostanoes;
 25 la Figura 7 es la curva de calibración de fosfatasa alcalina obtenida en el Ejemplo 1;
 la Figura 8 es la curva de calibración de fosfatasa alcalina obtenida en el Ejemplo 2;
 la Figura 9 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo 3;
 la Figura 10 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo 4;
 la Figura 11 es la curva de calibración de β -galactosidasa obtenida en el Ejemplo 5;
 30 la Figura 12 es la curva de calibración de β -galactosidasa obtenida en el Ejemplo 6;
 la Figura 13 es la curva de calibración de β -galactosidasa obtenida en el Ejemplo 7;
 la Figura 14 es la curva de calibración de β -galactosidasa obtenida en el Ejemplo 8;
 la Figura 15 es la curva de calibración de β -galactosidasa obtenida en el Ejemplo 9;
 la Figura 16 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo 10;
 35 la Figura 17 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo 11;
 la Figura 18 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo 12;
 la Figura 19 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo 13;
 la Figura 20 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo de Referencia 7;
 la Figura 21 es la curva de calibración de β -galactosidasa obtenida en el Ejemplo de Referencia 8;
 40 la Figura 22 es la curva de calibración de peroxidasa de rábano obtenida en el Ejemplo 14; y
 la Figura 23 es la curva de calibración de Pumilio obtenida en el Ejemplo 15.

[Mejor modo de llevar a cabo la invención]

[Nuevo sustrato]

45

La presente invención se refiere a un derivado de androsterona representado por la siguiente fórmula (1).



5 en la que, X representa -O-CO-R, R representa un grupo alquilo C₁₋₆ o un grupo fenilo, e Y¹ e Y² representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y¹ representa hidrógeno, e Y² representa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁₋₆ o un grupo alquilo C₁₋₆.

El grupo alcoxi C₁₋₆ como ejemplo de Y² puede ser, por ejemplo, un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo propoxi, y el grupo alquilo C₁₋₆ puede ser, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo iso-propilo, un grupo n-propilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo n-hexilo,
 10 -CO- en -O-CO-R significa (C=O)-, y el grupo alquilo C₁₋₆ en R puede ser, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo iso-propilo, un grupo n-propilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo n-hexilo. Además, R puede ser un grupo fenilo y puede tener un grupo funcional.

Los presentes compuestos de la presente invención se pueden sintetizar basándose en o por referencia a los
 15 métodos que se describen en los Ejemplos.

[Ensayo de ciclo enzimático]

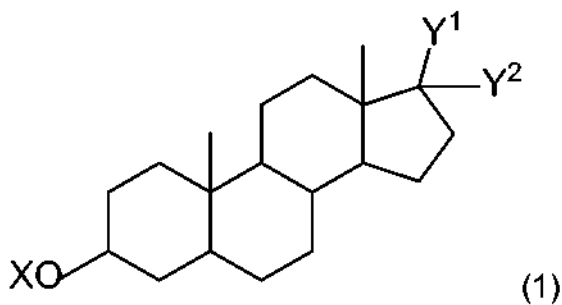
20 La presente invención se refiere a un ensayo enzimático que usa un complejo anticuerpo-enzima, en el que la cuantificación de un producto de reacción mediante la enzima del complejo anticuerpo-enzima se lleva a cabo mediante la producción de tio-NADH y/o tio-NADPH por reacción de ciclo enzimático usando NADH y/o NADPH, tio-NAD y/o tio-NADP, y deshidrogenasa (DH), y sometiendo a ensayo la cantidad del tio-NADH y/o tio-NADPH producido, o midiendo el cambio del color por el tio-NADH y/o tio-NADPH producido.

25 El complejo anticuerpo-enzima consiste en un anticuerpo específico frente a un antígeno de la proteína diana y una enzima marcada con este anticuerpo, y se usa en el ensayo de la proteína diana mencionada anteriormente.

30 Además, la presente invención se refiere un método para someter a ensayo una sonda de ácido nucleico usando una sonda de ácido nucleico marcada con enzima, en el que la cuantificación de un producto de reacción mediante la enzima de la sonda de ácido nucleico marcada con enzima se lleva a cabo produciendo tio-NADH y/o tio-NADPH por reacción de ciclo enzimático usando NADH y/o NADPH, tio-NAD y/o tio-NADP, y deshidrogenasa (DH), y sometiendo a ensayo la cantidad del tio-NADH y/o tio-NADPH producido, o midiendo el cambio del color por el tio-NADH y/o tio-NADPH producido.

35 La sonda de ácido nucleico marcada con enzima consiste en una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico diana y una enzima marcada con esta sonda de ácido nucleico, y se usa en el ensayo del ácido nucleico diana mencionado anteriormente.

40 En el método de la presente invención, la enzima (enzima de marcaje) del complejo anticuerpo-enzima o la sonda de ácido nucleico marcada con enzima usada es peroxidasa. Como sustrato de la enzima anterior, se usa el derivado de androsterona representado por la siguiente fórmula (1).



Se usa el derivado de androsterona representado por la fórmula (1) como sustrato de peroxidasa, X representa -O-CO-R (siempre que R represente un grupo alquilo C₁₋₆ o un grupo fenilo), Y¹ e Y² representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y¹ representa hidrógeno, e Y² representa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi C₁₋₆, o un grupo alquilo C₁₋₆. El derivado de androsterona incluido es el compuesto nuevo de la presente invención.

El ensayo de ultraalta sensibilidad de la presente invención se puede llevar a cabo de forma similar a un inmunoensayo enzimático o ensayo de sonda de ácido nucleico habitual. Por ejemplo, se puede usar un vehículo en fase sólida, que se use en un ensayo habitual, por ejemplo, un vehículo en fase sólida tal como una microplaca o tubo de plástico, una perla magnética y similar en el que un anticuerpo o sonda de ácido nucleico se une específicamente a un sujeto que está inmovilizado sobre la superficie.

El complejo del anticuerpo y la sonda de ácido nucleico-enzima se puede preparar mediante un método habitual.

El anticuerpo que constituye el complejo anticuerpo-enzima se puede seleccionar de forma adecuada entre los anticuerpos que se unen específicamente a un sujeto que se va a medir mediante el inmunoensayo enzimático de la presente invención. Por ejemplo, el inmunoensayo enzimático de la presente invención se usa en un ensayo de una proteína, y en el presente documento el anticuerpo que consiste en el complejo anticuerpo-enzima es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína que es el sujeto. Además, en este caso, se usa una placa basal en la que está inmovilizado sobre la superficie un anticuerpo que se une específicamente a la proteína sujeto. Además, el anticuerpo que constituye el complejo anticuerpo-enzima y el anticuerpo inmovilizado sobre la placa basal pueden ser un fragmento del anticuerpo. En la presente invención del inmunoensayo enzimático, el sujeto no se limita a una proteína, y puede ser cualquier sustancia que sea un sujeto de medición de un inmunoensayo enzimático habitual además de una proteína.

En el complejo de sonda de ácido nucleico y enzima, la sonda se puede seleccionar adecuadamente de forma similar entre las sondas complementarias a una sonda de ácido nucleico que es complementaria al sujeto de medición.

En el método de la presente invención, la cuantificación de un producto de reacción mediante la enzima del complejo anticuerpo-enzima o la enzima de la sonda de ácido nucleico marcada con enzima se lleva a cabo mediante la producción de tio-NADH y/o tio-NADPH por reacción de ciclo enzimático usando NADH y/o NADPH, tio-NAD y/o tio-NADP, y deshidrogenasa (DH), y sometiendo a ensayo la cantidad del tio-NADH y/o tio-NADPH producido, o midiendo el cambio del color por el tio-NADH y/o tio-NADPH producido.

En el método de la presente invención, la concentración de cada componente puede estar en el intervalo que se describe a continuación.

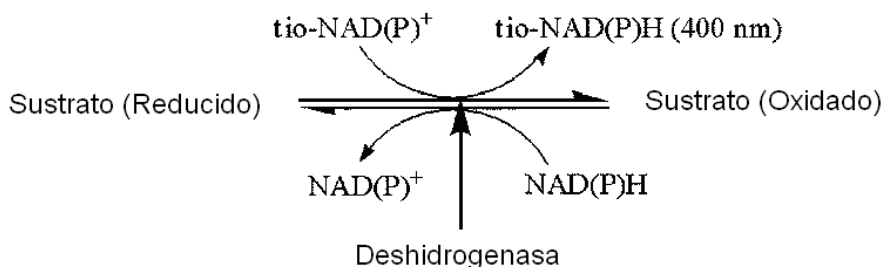
- (1) Intervalo de concentración del complejo anticuerpo-enzima o la sonda de ácido nucleico marcada con enzima: 0,01 µg/ml a 1 mg/ml
- (2) Intervalo de concentración del sustrato de la enzima de marcaje: 1 µM a 500 mM
- (3) Intervalo de concentración de NADH y/o NADPH: 0,01 mM a 50 mM
- (4) Intervalo de concentración de tio-NAD y/o tio-NADP: 0,01 mM a 100 mM
- (5) Intervalo de concentración de la deshidrogenasa (DH): 0,01 U/ml a 5000 U/ml

Las condiciones de reacción se pueden determinar de forma adecuada considerando el intervalo de temperatura óptimo de la enzima de marcaje y la deshidrogenasa (DH). Por ejemplo, en cuanto a la temperatura de reacción, la reacción se lleva a cabo preferentemente a temperatura ambiente desde el punto de vista de una manipulación sencilla. Sin embargo, la reacción se puede llevar a cabo a una temperatura mayor o una temperatura menor que la temperatura ambiente considerando el intervalo de temperatura óptimo de la enzima de marcaje y la deshidrogenasa (DH).

El tiempo de reacción puede ser un tiempo suficiente para acumular tio-NADH y/o tio-NADPH, de un modo tal que permita el ensayo de la cantidad del tio-NADH y/o tio-NADPH producido, o la medición del cambio de color por el tio-NADH y/o tio-NADPH producido. Sin embargo, la cantidad de acumulación de tio-NADH y/o tio-NADPH necesaria para el ensayo o la medición varía dependiendo de las condiciones del ensayo o la medición, y se puede determinar de forma adecuada dependiendo de las condiciones.

El sistema de ciclo que usa tio-NAD(P) en el sistema de ciclo enzimático es un sistema de ciclo único que ha aparecido de forma relativamente reciente. Con este sistema, se lleva a cabo un ciclo, es decir, tio-NAD(P)/tio-NAD(P)H usando deshidrogenasa (DH) con NAD(P)/NAD(P)H como coenzima en condiciones de coexistencia de NAD(P)/NAD(P)H y su análogo, y la amplificación y la cuantificación se llevan a cabo con tio-NAD(P)H (longitud de

onda de absorción máxima: 400 nm, coeficiente de absorción molar = 11.900) como sustrato de la deshidrogenasa. El principio para la medición del sistema de ciclo de tio-NAD(P) es como se describe a continuación.



5 Mientras que el NADH exhibe la absorción máxima a 340 nm (coeficiente de absorción molar = 6200), tio-NAD(P)H exhibe absorción en el intervalo visible (longitud de onda de absorción máxima: 400 nm, coeficiente de absorción molar = 11900) y de ese modo el método de ciclo de tio-NAD(P) tiene la ventaja de permitir la medición usando un espectrofotómetro de absorción o un lector de microplaca generalizado para la medición colorimétrica.

10 Usando las ventajas de que la medición en el sistema de ciclo que usa tio-NAD(P) se puede llevar a cabo mediante el uso de un espectrofotómetro de absorción o un lector de microplaca generalizado para la medición colorimétrica, algunos métodos convencionales basados en el aumento de la absorción de NADH, tales como un ensayo de actividad y cuantificación de deshidrogenasa de un sustrato de la misma, han mejorado a un método que usa tio-NAD. Sin embargo, aún no ha habido ningún informe del uso de este sistema de ciclo en la mejora de sensibilidad como sistema de detección tal como un inmunoensayo enzimático.

15 En la presente invención, la combinación de una enzima de marcaje y el sistema de ciclo permite que la reacción de amplificación sea una reacción exponencial por primera vez, dando como resultado de ese modo una mejora de sensibilidad suficiente.

20 De acuerdo con el ensayo de la presente invención, como se muestra a modo de ejemplo en el inmunoensayo enzimático, los productos producidos con el complejo de enzima y un sustrato en combinación se usan como sustrato de la siguiente reacción de ciclo enzimático, y la absorción del tio-NAD(P)H producido por la reacción de ciclo enzimático se cuantifica colorimétricamente. El ciclo enzimático se lleva a cabo con una deshidrogenasa en esta reacción, y de ese modo se puede usar un sustrato reducido o un sustrato oxidado como sustrato de la reacción de ciclo enzimático.

25 En la presente invención, la enzima de marcaje usada como complejo de enzima, el sustrato de la misma y la deshidrogenasa usada posteriormente en la reacción de ciclo tienen las propiedades que se describen a continuación.

- 30
- (1) El producto de la enzima de marcaje es androsterona o un derivado de la misma;
 - (2) se pueden usar enzimas de marcaje disponibles en el mercado y usadas ampliamente;
 - 35 (3) el número de recambio del ciclo enzimático es muy elevado; y
 - (4) la deshidrogenasa usada en esta reacción de ciclo no tiene ninguna contaminación de la enzima de marcaje ni actividad similar a la de la enzima de marcaje.

40 Algunos ejemplos de la deshidrogenasa (DH) pueden incluir, por ejemplo, 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Por ejemplo, cuando se usa 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa como enzima de ciclo entre las combinaciones descritas anteriormente, algunos ejemplos de un candidato para el sustrato que se puede usar androsterona, 11 β -hidroxiandrosterona, 11-oxoandrosterona y 11 α -hidroxiandrosterona.

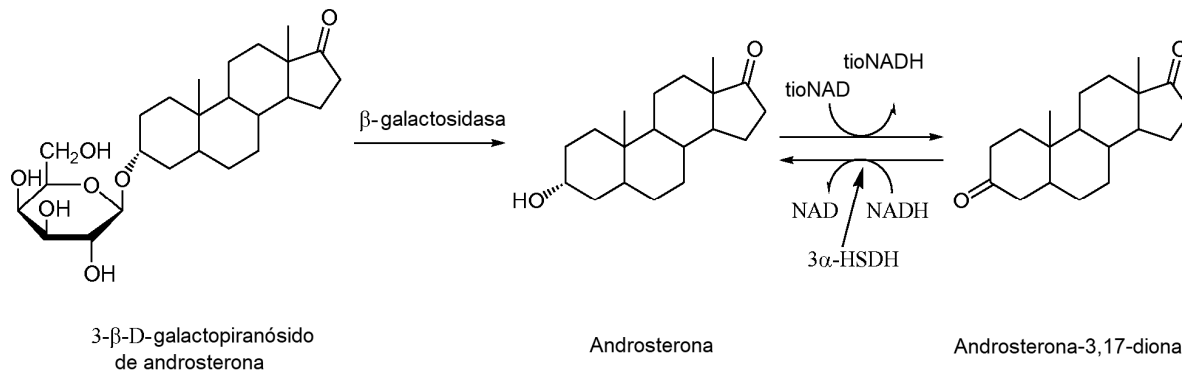
45 El sustrato para el ciclo es preferentemente el que tiene una velocidad de reacción enzimática elevada (que tiene una alta actividad por el sustrato) y que reacciona incluso a una concentración baja (que tiene un valor bajo de Km). Además, una propiedad deseable como deshidrogenasa es la velocidad de reacción cuando se usa tio-NAD(P) como coenzima. En la reacción de deshidrogenación de androsterona mediante muchas otras deshidrogenasas, la velocidad de reacción cuando se usa tio-NAD como coenzima está dentro de varios % de la velocidad de reacción cuando se usa NAD, mientras que con 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la velocidad de reacción con tio-NAD es aproximadamente un 59 % de la velocidad de reacción con NAD. De ese modo, 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa tiene una propiedad deseable como enzima de ciclo de la presente invención.

55 Además, de manera similar, la peroxidasa, que se usa ampliamente como enzima de marcaje, y el peróxido de un derivado de androsterona, por ejemplo, peróxido de terc-butilo, también son una combinación preferible en un punto

de síntesis sencilla.

Un ejemplo de reacción que usa 3-β-D galactósido de androsterona como sustrato se describirá a continuación, pero dicho ejemplo no representa la presente invención.

5



A continuación, se explicará a modo de ejemplo un inmunoensayo enzimático que usa fosfatasa alcalina (ALP) como enzima del complejo anticuerpo-enzima, pero dicho ejemplo no representa la presente invención. La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima usada ampliamente como enzima de marcaje y, cuando el derivado de androsterona se usa como sustrato de ALP en un inmunoensayo enzimático que usa esta ALP, se produce androsterona como producto de reacción. A continuación, se usa 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α-HSD), deshidrogenasa que usa el producto de reacción de ALP como sustrato, en la reacción de ciclo enzimático.

10

15

El ciclo de tio-NAD permite la amplificación y la cuantificación del sustrato de deshidrogenasa con una eficacia de cientos de ciclos por minuto si se selecciona una reacción de deshidrogenasa apropiada. En consecuencia, la actividad de la enzima que presenta tal sustrato como producto de reacción se puede someter a ensayo mediante el ciclo de tio-NAD con una sensibilidad ultraalta.

20

[Kit para ciclo enzimático]

La presente invención incluye un kit para el método de ciclo enzimático que incluye una enzima marcada con un vehículo reactivo, un sustrato de la misma, una enzima para la reacción de ciclo y tio-NAD y NADH como coenzima de la misma.

25

El vehículo reactivo representa un anticuerpo, una sonda de ácido nucleico, lectina y similar que tiene actividad de unión frente al sujeto de medición.

30

El vehículo reactivo no se limita de forma particular si es un material adecuado para el sujeto de medición, o un material adecuado para la enzima de marcaje y el sustrato de la misma.

Más específicamente, la presente invención incluye un kit para un método de ciclo enzimático que incluye una enzima de marcaje, un sustrato de la misma, una enzima para la reacción de ciclo y tio-NAD y NADH como coenzima de la misma.

35

El kit de la presente invención es un kit para inmunoensayo enzimático que incluye los siguientes reactivos (1) a (5).

- (1) peroxidasa, enzima que está marcada con un anticuerpo específico frente a un antígeno de proteína diana,
- (2) derivado de androsterona representado por la fórmula (1), que es un sustrato de la enzima,
- (3) deshidrogenasa (DH),
- (4) NADH y/o NADPH, y
- (5) tio-NAD y/o tio-NADP.

40

Además, la presente invención es un kit para medir una sonda de ácido nucleico, que incluye los siguientes reactivos (1) a (5).

45

- (1) peroxidasa, enzima que está marcada con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico diana,
- (2) derivado de androsterona representado por la fórmula (1), que es un sustrato de la enzima,
- (3) deshidrogenasa (DH),
- (4) NADH y/o NADPH, y
- (5) tio-NAD y/o tio-NADP.

50

Para la enzima de marcaje, la deshidrogenasa (DH) y el derivado de androsterona representado por la fórmula (1), los que se pueden usar son los descritos anteriormente en el método de la presente invención como tales.

5 El kit de la presente invención puede ser un anticuerpo marcado con enzima convencional y similar en combinación con los reactivos que constituyen este kit. Este kit se puede usar en un inmunoensayo enzimático que usa un método de ciclo enzimático.

[Ejemplos]

10 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá basándose en Ejemplos. Sin embargo, tales Ejemplos se pueden modificar de forma diversa en el nivel técnico de este campo. No es necesario decir que la presente invención no pretende limitarse a estos Ejemplos únicamente, a la luz de tal nivel técnico.

15 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá de manera más específica en los siguientes Ejemplos. Los siguientes Ejemplos que se refieren a la fosfatasa alcalina o la peroxidasa no son de acuerdo con la presente invención, pero se muestran como prueba de principio. Únicamente aquellos Ejemplos que se refieren a derivados de peroxidasa y peroxi de androsterona se considerarán de acuerdo con la invención.

20 Ensayo de fosfatasa alcalina y Pumilio que usa sistema de ciclo de tio-NAD de fosfatasa alcalina (ALP) y 3-fosfato de androsterona (A3P) como sistema de detección.

Ejemplo de Referencia 1

25 Fabricación de anticuerpo marcado con ALP

Un anticuerpo monoclonal derivado de ratón que tenía reactividad específica frente a antígeno se dializó tres veces con solución tampón de ácido cítrico 0,1 M (pH 3,5) durante 30 minutos. A la solución de anticuerpo se añadió pepsina hasta un 0,5 % con respecto a la cantidad de anticuerpo, se mantuvo a 37 °C durante 1 hora, y a continuación se ajustó a pH neutro con solución tampón de Tris 1,5 M (pH 8,8). Esta solución de reacción mixta se filtró sobre gel usando una columna rellena con Superdex 200 (Amersham Biosciences, Inc.), para dar F(ab')₂.

La ALP se marcó mediante un kit de marcaje de ALP (DOJINDO LABORATORIES) usando 100 µg de este F(ab')₂.

Ejemplo de Referencia 2

35

Preparación de vehículo insoluble inmovilizado con anticuerpo 1

Una solución de un anticuerpo policlonal derivado de cobaya que tenía reactividad específica frente a antígeno disuelto en solución tampón de carbonato sódico 50 mM (pH 9,6) a una concentración de 100 µg/ml, se añadió a cada pocillo de una microplaca de fondo plano (Nunc A/S) con 50 µl de cada uno, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora, y a continuación se recogió la solución de anticuerpo. Se añadieron 300 µl de TBS que contenían albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 horas para llevar a cabo el tratamiento de bloqueo, para dar una microplaca con anticuerpo policlonal inmovilizado.

45 Ejemplo de Referencia 3

Preparación de vehículo insoluble inmovilizado con anticuerpo 2

50 Una solución de un anticuerpo policlonal derivado de cobaya que tenía reactividad específica frente a antígeno disuelto en solución tampón de carbonato sódico 50 mM (pH 9,6) a una concentración de 10 µg/ml, se añadió a cada pocillo de una microplaca de fondo plano (Nunc A/S) con 50 µl de cada uno, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la solución del pocillo se retiró con succión, se añadieron 300 µl de TBS que contenían albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1 % y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 horas para llevar a cabo el tratamiento de bloqueo, y se lavaron con TBS que contenía Tween 20 al 0,05 %, para dar una microplaca con anticuerpo policlonal inmovilizado.

<Ejemplo Comparativo 1>

60 Ensayo de Pumilio mediante método en una etapa usando 3-fosfato de 5α-androsterona

Solución de ensayo de reacción

65 solución tampón de glicina 0,2 M (pH 8,8)
1,5 mM tio-NAD
1 mM NADH
3-fosfato de 5α-androsterona 0,5 mM

20 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra de ensayo

5 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 50, 100 y 200 ng/ml de Pumilio

Método de ensayo

10 A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado con el método del Ejemplo de Referencia 2, se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 200 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación la microplaca se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Tween 20 al 0,05 %. Se añadieron a la microplaca 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio marcado con ALP preparado con el método del Ejemplo de Referencia 1 a una concentración de 2,5 μ g/ml, y la microplaca se agitó durante 1 hora. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación la microplaca se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Tween 20 al 0,05 %, y se lavó además con TBS. A continuación, se añadieron 100 μ l de la solución de ensayo de reacción a cada pocillo, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 30 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 30 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 2.

25 En el presente ensayo, se presentaron como problemas la mala reactividad de la enzima (fosfatasa alcalina) con el sustrato (3-fosfato de androsterona), y la inhibición del sustrato en la reacción de ciclo, y de ese modo se probó un método en dos etapas en el que se separan la reacción enzimática y la reacción de ciclo. Además, se descubrió que la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, en la reacción de ciclo una enzima tenía actividad de fosfatasa, y fue una causa para el blanco, y de ese modo se determinó usar una solución tampón que contenía ácido fosfórico en el momento de la reacción de ciclo del método en dos etapas.

30 <Ejemplo Comparativo 2>

Ensayo de Pumilio mediante método en dos etapas usando 3-fosfato de 5 α -androsterona

35 Solución de ensayo de reacción A

solución tampón de Tris 0,1 M (pH 8,3)
MgCl₂ 1 mM
3-fosfato de 5 α -androsterona 0,1 mM

40

Solución de ensayo de reacción B

solución tampón de glicina 0,2 M que contenía hidrogenofosfato disódico 0,2 M (pH 9,6)
tio-NAD 3 mM
NADH 1 mM
40 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

45

Muestra de ensayo

50 0,5, 0,75, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 20, 50, 75, y 100 ng/ml de Pumilio

Método de ensayo

55 A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado en el método del Ejemplo de Referencia 3, se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 100 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación la microplaca se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Tween 20 al 0,05 %. Se añadieron a la microplaca 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio marcado con ALP preparado en el método del Ejemplo de Referencia 1 a una concentración de 2,5 μ g/ml, y la microplaca se agitó durante 1 hora. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación la microplaca se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Tween 20 al 0,05 %, y se lavó además con TBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 μ l de la solución de ensayo de reacción A, respectivamente, y la microplaca se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron al pocillo 50 μ l de la solución de ensayo de reacción B, y la absorbancia se midió durante 30 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de

65

absorbancia durante 30 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 3.

- 5 Aunque se probó el método en dos etapas, la sensibilidad no aumentó tanto como se esperaba y, de ese modo, se determinó usar 3-fosfato de 5 β -androsterona, que tiene una estructura diferente que la del 3-fosfato de 5 α -androsterona usado hasta el momento, con el fin de mejorar la reactividad con fosfatasa alcalina.

<Ejemplo Comparativo 3>

- 10 Ensayo de Pumilio mediante método en una etapa usando 3-fosfato de 5 β -androsterona

Solución de ensayo de reacción

- 15 solución tampón de Tris 0,1 M (pH 8,6)
 MgCl₂ 0,5 mM
 tio-NAD 1,5 mM
 NADH 0,5 mM
 3-fosfato de 5 β -androsterona 0,5 mM
 20 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra de ensayo

0,1, 0,5, 1, 2, 5, 8, 10, 20 y 50 ng/ml de Pumilio

- 25 Método de ensayo

- A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado en el método del Ejemplo de Referencia 3, se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 50 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación la microplaca se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Tween 20 al 0,05 %. Se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio marcado con ALP preparado en el método del Ejemplo de Referencia 1 a una concentración de 2,5 μ g/ml, y la microplaca se agitó durante 1 hora. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación la microplaca se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Tween 20 al 0,05 %, y se lavó además con TBS. A continuación, a cada pocillo, se añadieron 50 μ l de la solución de ensayo de reacción, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 30 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 30 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 4.

<Ejemplo Comparativo 4>

- 45 Ensayo de Pumilio mediante método en dos etapas usando 3-fosfato de 5 β -androsterona

Solución de ensayo de reacción A

- 50 solución tampón de Tris 0,1 M (pH 8,3)
 MgCl₂ 1 mM
 3-fosfato de 5 β -androsterona 0,1 mM

Solución de ensayo de reacción B

- 55 solución tampón de glicina 0,2 M que contenía hidrogenofosfato disódico 0,2 M (pH 9,6)
 tio-NAD 3 mM
 NADH 1 mM
 40 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra de ensayo

- 60 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2,5, 5, 10, 25 y 50 ng/ml de Pumilio

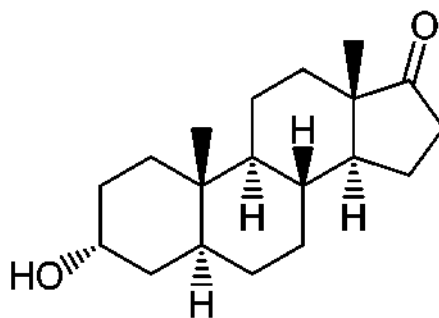
Método de ensayo

- 65 A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado en el método del Ejemplo de Referencia 3, se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que

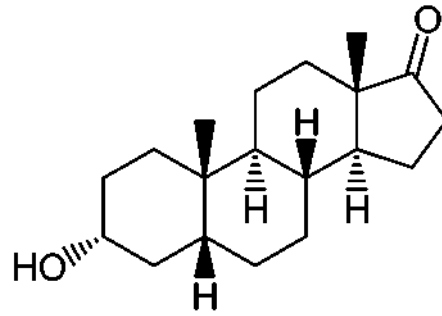
- 5 contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 50 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación la microplaca se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Tween 20 al 0,05 %. Se añadieron a la microplaca 50 µl de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio
- 10 marcado con ALP preparado en el método del Ejemplo de Referencia 1 a una concentración de 2,5 µg/ml, y la microplaca se agitó durante 1 hora. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación la microplaca se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Tween 20 al 0,05 %, y se lavó además con TBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de la solución de ensayo de reacción A, respectivamente, y la microplaca se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron al pocillo 50 µl de la solución de ensayo de reacción B, y la
- 15 absorbancia se midió durante 10 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 10 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 5.
- 20 Se descubrió que el 3-fosfato de androsterona fue un sustrato de la reacción de ciclo hasta el momento, y el aumento del blanco mediante este resultado se convirtió en un problema. Se determinó que la causa fue la cetona en la posición 17, y de ese modo se determinó usar un sustrato en el que se retirara o se sustituyera la cetona en la posición 17. Los 3α-hidroxiandrostano sintetizados se muestran en la Figura 6. Además, los números de rotación de las reacciones de ciclo que los usan como sustrato se muestran en la Tabla 1. Entre ellos, el número de rotación de la 5α-androsterona fue el máximo, y los sustratos que estuvieron cerca de este fueron 3α-hidroxi-17β-metoxi-5β-androstano y 5α-dihidrotestosterona. De ese modo, se sintetizó un éster de fosfato del primero, es decir, 3-fosfato de 3α-hidroxi-17β-metoxi-5β-androstano y se aplicó al ciclo de tío-NAD.

Tabla 1: números de rotación de reacciones de ciclo con 3α-hidroxiandrostano

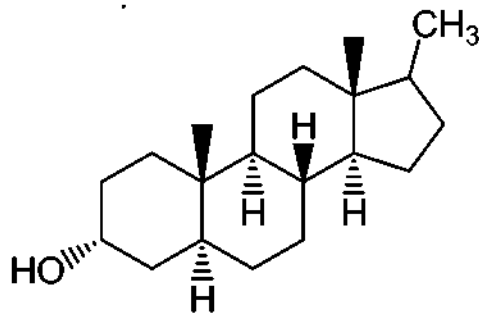
	Ciclos/min	Valor relativo (%)
5α-Androsterona	623	100
5β-Androsterona	384	62
5α-17-CH ₃	200	32
5α-17-desoxo	241	39
5α-17-CH ₂	308	49
5β-17-CH ₃	114	18
5β-17β-OCH ₃	458	74
5α-DHT	535	86
Glicoquenodesoxicolato (Ejemplo de Referencia)	129	21



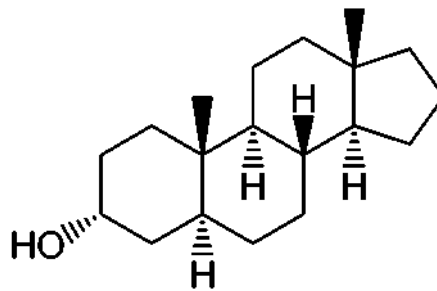
5α-Androsterona



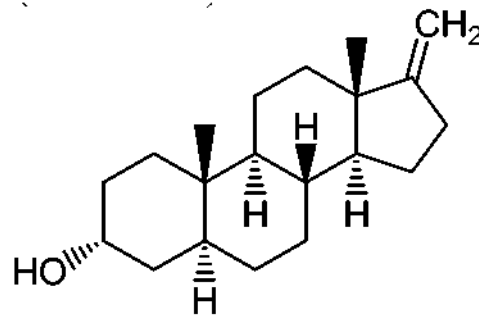
5β-Androsterona



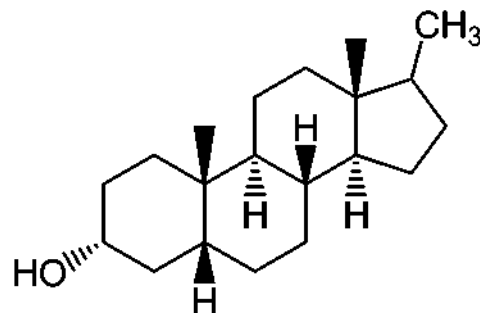
3α-Hidroxi-17β-metil-5α-Androstano (5α-17-CH₃)



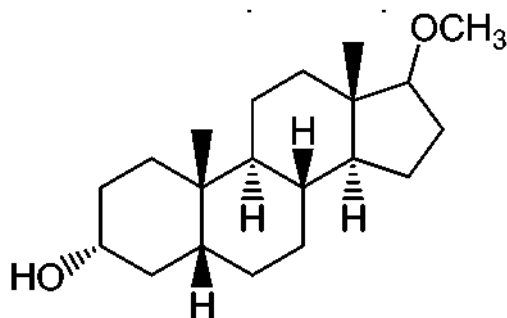
3α-Hidroxi-5α-Androstano (5α-17-desoxo)



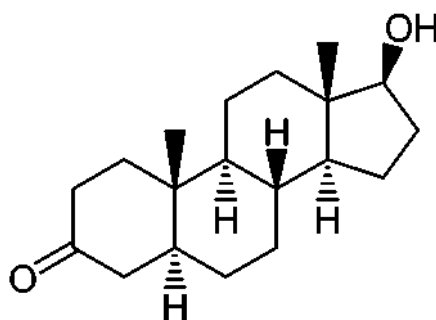
3α-Hidroxi-17-metilen-5α-Androstano (5α-17-CH₂)



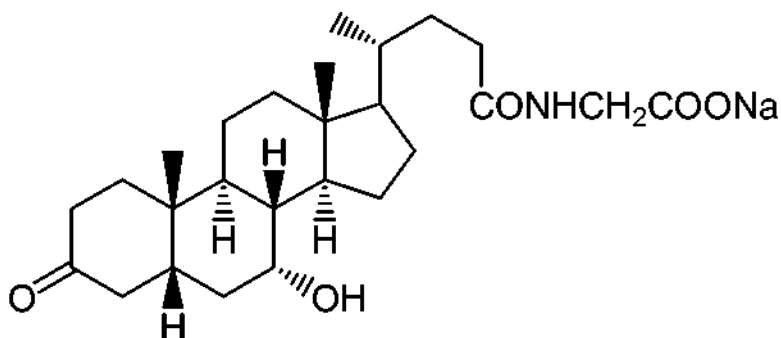
3α-Hidroxi-17β-metil-5β-Androstano (5β-17-CH₃)



3α-Hidroxi-17β-metoxi-5β-Androstano (5β-17-OCH₃)



5α-Dihidrotosterona (5α-DHT)



Glicoquenosodexicolato sódico

5

<Ejemplo 1> Ensayo de fosfatasa alcalina mediante método en una etapa usando 3-fosfato de 3α-hidroxi-17β-metoxi-5β-androstano

10

Síntesis de 3-fosfato de 3α-hidroxi-17β-metoxi-5β-androstano

A una solución en piridina anhidra (4 ml) de oxicluro de fósforo (0,26 ml), se añadió gota a gota una solución en piridina anhidra (4 ml) que contenía de 3α-hidroxi-17β-metoxi-5β-androstano (200 mg) con refrigeración en hielo, y la solución de reacción se agitó adicionalmente durante 1 hora con refrigeración en hielo. La solución de reacción se vertió en agua enfriada con hielo, y la solución se hizo fuertemente alcalina (aproximadamente pH 11), y a continuación se lavó con éter. A continuación, se añadió ácido clorhídrico concentrado a la fase acuosa para ajustar el pH a aproximadamente 2, y a continuación se extrajo con éter. La fase de éter se secó con sulfato sódico anhidro, y a continuación el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El residuo se recristalizó con tetrahidrofurano-hexano para dar un cristal incoloro (210 mg).

15

20

RMN ¹H (400 MHz, Metanol-d₄) δ = 0,73 (s, 3H, 18-CH₃), 0,95 (s, 3H, 19-CH₃), 3,19 (1H, t, J = 8,6 Hz, 17α-H), 3,32 (s, 3H, -OCH₃), 4,18 (m, 1H, 3β-H). ESI-HR-MS Calculado para C₂₀H₃₅O₅P-H: m/z 385,2149 [M-H]⁻. Encontrado m/z 385,2157; p.f. 187-188 °C.

25

Solución de ensayo de reacción

- solución tampón de Tris 0,1 M (pH 9,5)
- MgCl₂ 0,2 mM
- tio-NAD 0,6 mM
- NADH 4 mM
- 3-fosfato de 3α-hidroxi-17β-metoxi-5β-androstano 0,5 mM

30

20 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra de ensayo

5 0,1, 0,2, 0,5, 1, y 2 mU/ml de fosfatasa alcalina (concentración final: 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, y 1 mU/ml)

Método de ensayo

10 A un pocillo de microplaca de fondo plano, se añadieron 50 μ l de solución tampón de Tris (pH 9,5) que contenía la sustancia patrón (fosfatasa alcalina) en un intervalo de 0 a 2 mU/ml y, posteriormente, se añadieron 50 μ l de solución de ensayo de reacción B a cada pocillo, respectivamente. A continuación, la absorbancia se midió durante 60 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 60 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 7.

20 Posteriormente, que es una enzima de la reacción de ciclo con respecto a la investigación del método en dos etapas, como se ha descrito anteriormente, se usó una solución tampón que contenía ácido fosfórico en el momento de la reacción de ciclo con el fin de inhibir la actividad de fosfatasa en 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Sin embargo, se adoptó una solución tampón que contenía ácido pirofosfórico en lugar de la solución tampón que contenía ácido fosfórico como solución tampón que inhibe además esta actividad de fosfatasa.

25 <Ejemplo 2> Ensayo de fosfatasa alcalina mediante método en dos etapas usando 3-fosfato de 3 α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano

Solución de ensayo de reacción A

30 solución tampón de Tris 0,1 M (pH 9,5)
MgCl₂ 0,2 mM
3-fosfato de 3 α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano 1 mM

Solución de ensayo de reacción B

35 solución tampón de pirofosfato 0,15 M (pH 9,5)
tio-NAD 3 mM
NADH 1 mM
40 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra de ensayo

40 1, 5, 10, 15, 20 μ U/ml de fosfatasa alcalina (concentración final: 0,5, 2,5, 5, 7,5 y 10 μ U/ml)

Método de ensayo

45 A un pocillo de microplaca de fondo plano, se añadieron 25 μ l de solución tampón de Tris (pH 9,5) que contenía la sustancia patrón (fosfatasa alcalina) en un intervalo de 0 a 20 μ U/ml y, posteriormente, se añadieron 25 μ l de solución de ensayo de reacción A al pocillo, respectivamente. La solución de reacción se mezcló, y se mantuvo a 37 °C en una incubadora durante 1 hora. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 μ l de la solución de ensayo de reacción B, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 20 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 20 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 8.

55 Ejemplo de Referencia 4

Purificación de anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina (ALP)

60 Se preparó anticuerpo marcado con ALP usando el kit de marcaje con ALP (DOJINDO LABORATORIES) a partir de 150 μ g del F(ab')₂ preparado en el Ejemplo de Referencia 1. Dado que esta solución de anticuerpo marcado con ALP contenía diversos complejos que tenían diversos pesos moleculares de ALP y Fab, y la solución anterior tenía variación en la actividad, la solución de anticuerpo marcado con ALP preparada se filtró en gel usando una columna superdex-200 (Amersham Biosciences, Inc.) rellena con solución tampón de Tris (pH 7,0) que contenía MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM y BSA al 0,01 % como solución de elución, y se comparó la actividad de cada fracción, y a continuación solo se recogió la fracción de anticuerpo marcado con ALP que tenía mayor proporción S/N.

Ejemplo de Referencia 5

Preparación de vehículo insoluble inmovilizado con anticuerpo

5 Una solución de un anticuerpo policlonal derivado de cobaya que tenía reactividad específica frente a antígeno se disolvió en solución tampón de carbonato sódico 50 mM (pH 9,6) a una concentración de 10 µg/ml se añadió a cada pocillo de una microplaca de fondo plano (Nunc A/S) con 50 µl cada uno, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora, y a continuación la solución en el pocillo se retiró con succión, y se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %. A continuación, se añadieron 200 µl de TBS que contenía albúmina de suero bovino al 5 % (BSA) y se mantuvieron a 4 °C durante 2 horas a una noche para llevar a cabo el tratamiento de bloqueo, y se lavaron con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, para dar una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal.

<Ejemplo 3> Ensayo de Pumilio mediante método en una etapa

15 Solución de ensayo de reacción que usa 3-fosfato de 3α-hidroxi-17β-metoxi-5β-androstano
solución tampón de Tris 0,1 M (pH 9,5)
tio-NAD 1,5 mM
NADH 2,5 mM
20 3-fosfato de 3α-hidroxi-17β-metoxi-5β-androstano 0,1 mM
20 U/ml de 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra de ensayo

25 0,1, 0,5, 2, 5, 10 y 25 ng/ml de Pumilio

Método de ensayo

30 A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado en el método del Ejemplo de Referencia 5, se añadieron 50 µl de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 25 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %. Se añadieron 50 µl de TBS (pH 7,5) que contenían solución a 0,1 % de BSA que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio marcado con ALP preparado en el método del Ejemplo de Referencia 4 en una concentración de aproximadamente 0,8 µg/ml, y la microplaca se agitó a 4 °C durante 2 horas. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se lavó además con TBS. A continuación, a cada pocillo, se añadieron 50 µl de la solución de ensayo de reacción, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 60 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 60 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 9.

<Ejemplo 4> Ensayo de Pumilio mediante método en dos etapas usando 3-fosfato de 3α-hidroxi-17β-metoxi-5β-androstano

Solución de ensayo de reacción A

50 solución tampón de Tris 0,1 M (pH 9,5)
MgCl₂ 0,1 mM
3-fosfato de 3α-hidroxi-17β-metoxi-5β-androstano 0,2 mM

Solución de ensayo de reacción B

55 solución tampón de pirofosfato 0,15 M (pH 9,5)
tio-NAD 3 mM
NADH 1 mM
40 U/ml de 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra

0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25 y 0,5 ng/ml de Pumilio

Método de ensayo

65 A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado con el método del

Ejemplo de Referencia 5, se añadieron 50 µl de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 0,5 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %. Se añadieron 50 µl de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio marcado con ALP preparado en el método del Ejemplo de Referencia 4 en aproximadamente 0,2 µg/ml y el F(ab')₂ de ratón a una concentración de 1 mg/ml, y la microplaca se agitó a 4 °C durante 2 horas. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el residuo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se lavó además con TBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de la solución de ensayo de reacción A, respectivamente, y la microplaca se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron al pocillo 50 µl de la solución de ensayo de reacción B, y la absorbancia se midió durante 30 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 30 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 10.

Aunque se usó un sustrato modificado en la posición 17, la reacción del blanco no se pudo retirar completamente como se ha descrito anteriormente. De ese modo, se usó β-galactosidasa como enzima de marcaje de ELISA, y se sintetizó β-D-galactósido de androsterona como sustrato de la misma, y la investigación prosiguió.

Ensayo de β-galactosidasa y Pumilio sistema de ciclo de tio-NAD de β-galactosidasa y 3-β-D-galactósido de androsterona usando como sistema de detección.

<Ejemplo 5> Ensayo de β-galactosidasa mediante método en dos etapas usando β-D-galactósido de 5β-androsterona

Síntesis de 3-β-D-galactósido de 5β-androsterona (nombre formal: 3-β-D-galactopiranosido de 5β-androsterona)

A una solución en diclorometano (15 ml) de 5β-androsterona (290 mg), se añadieron MS4A (1,25 g) y 2,3,4,6-O-tetrabenzoil-1-tio-β-D-galactopiranosido de fenilo (1,03 g) y la solución de reacción se agitó a -20 °C durante 15 minutos. A continuación, se añadió a la solución de reacción N-yodosuccinimida (435 mg) y ácido trifluorometano sulfónico (15 mg), se agitó a -20 °C durante 2 horas, y a continuación se hizo reaccionar adicionalmente a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron a la solución de reacción 250 µl de trietilamina para detener la reacción, y se lavó con una solución mixta de carbonato sódico saturado y tiosulfato sódico 3:1, y solución salina saturada secuencialmente. La fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro, y a continuación el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol (15 ml), y se añadió metóxido sódico al 28 % (500 µl) y la solución de reacción se agitó durante 2 horas. Se añadió ácido acético a la solución de reacción para neutralizarla, y a continuación se evaporó hasta sequedad a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (24 x 240 mm, 10 % de metanol-cloroformo), y a continuación se recristalizó en metanol para dar un cristal incoloro (360 mg).
RMN ¹H (400 MHz, Metanol-d₄) δ = 0,85 (s, 3H, 18-CH₃), 0,97 (s, 3H, 19-CH₃), 3,44-3,49 (m a, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3,70 (d, 1H, H-6'a), 3,72 (d, 1H, H-6'b), 3,73 (m, 1H, 3β-H), 3,81 (d, 1H, H-4'), 4,33 (d, 1H, H-1', J_{1', 2'} = 6,2 Hz) ESI-HR-MS Calculado para C₂₅H₄₀O₇-H: m/z 451,2701 [M-H]⁻. Encontrado m/z 451,2711 p.f. 130-135 °C.

45 Solución de ensayo de reacción A

solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,3)
MgCl₂ 0,2 mM
β-D-galactósido de 5β-androsterona 0,1 mM

50 Solución de ensayo de reacción B

solución tampón de pirofosfato 0,1 M (pH 9,0)
tio-NAD 1,2 mM
NADH 3,6 mM
40 U/ml de 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra

60 1, 4, 10, 40, 100, y 200 pg/ml de β-galactosidasa (concentración final: 0,5, 2, 5, 20, 50 y 100 pg/ml)

Método de ensayo

65 A un pocillo de microplaca de fondo plano, se añadieron 25 µl de una solución tampón de fosfato (pH 7,3) que contenía la sustancia patrón (β-galactosidasa) en un intervalo de 0 a 200 pg/ml, y posteriormente, se añadieron 25 µl de la solución de ensayo de reacción A al pocillo, respectivamente. La solución de reacción se mezcló, y la

microplaca se incubó a 37 °C durante 60 minutos. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de la solución de ensayo de reacción B, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 30 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 30 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 11.

<Ejemplo 6> Ensayo de β-galactosidasa mediante método en una etapa usando β-D-galactósido de 5β-androsterona

10 Solución de ensayo de reacción

solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,7)
 MgCl₂ 10 mM
 tio-NAD 6 mM
 15 NADH 1 mM
 β-D-galactósido de 5β-androsterona 0,1 mM
 40 U/ml de 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa

20 Muestra

5, 10, 25, 50, 100, y 250 pg/ml de β-galactosidasa (concentración final: 2,5, 5, 12,5, 25, 50 y 125 pg/ml)

Método de ensayo

25 A un pocillo de microplaca de fondo plano, se añadieron 50 µl de una solución tampón de fosfato (pH 7,7) que contenía la sustancia patrón (β-galactosidasa) en un intervalo de 0 a 250 pg/ml, y posteriormente, se añadieron a cada pocillo 50 µl de la solución de ensayo de reacción B, respectivamente. La absorbancia se midió durante 120 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 120 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 12.

<Ejemplo 7> Ensayo de β-galactosidasa mediante método en dos etapas usando β-D-galactósido de 5β-androsterona

35 Solución de ensayo de reacción A

solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,5)
 MgCl₂ 10 mM
 40 β-D-galactósido de 5β-androsterona 0,1 mM

Solución de ensayo de reacción B

45 solución tampón de pirofosfato 0,1 M (pH 9,0)
 tio-NAD 4,8 mM
 NADH 0,4 mM
 40 U/ml de 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa

50 Muestra

1, 4, 10, 40, 100 y 200 pg/ml de β-galactosidasa (concentración final: 0,5, 2, 5, 20, 50 y 100 pg/ml)

Método de ensayo

55 A un pocillo de microplaca de fondo plano, se añadieron 25 µl de una solución tampón de fosfato (pH 7,5) que contenía la sustancia patrón (β-galactosidasa) en un intervalo de 0 a 200 pg/ml, y posteriormente, se añadieron al pocillo 25 µl de solución de ensayo de reacción A, respectivamente. La solución de reacción se mezcló, y la microplaca se incubó a 37 °C durante 60 minutos. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de solución de ensayo de reacción B, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 30 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 30 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 13.

65 <Ejemplo 8> Ensayo de β-galactosidasa mediante método en una etapa usando β-D-galactósido de 3α-hidroxi-17β-metoxi-5β-androstano

Síntesis de 3 α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano β -D-galactósido de (nombre formal: 3- β -D-galactopiranosido de 3 α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano)

- 5 A una solución en diclorometano (15 ml) de 3 α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano (306 mg), se añadieron MS4A (1,25 g) y 2,3,4,6-O-tetrabenzoil-1-tio- β -D-garactopiranosido de fenilo (1,03 g) y la solución de reacción se agitó a -20 °C durante 15 minutos. A continuación, se añadieron N-yodosuccinimida (435 mg) y ácido trifluorometano sulfónico (15 mg), la solución de reacción se agitó a -20 °C durante 2 horas, y a continuación se hizo reaccionar adicionalmente a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron a la solución de reacción 250 μ l de trietilamina para detener la reacción, y se lavó secuencialmente con una solución mixta de carbonato sódico saturado y tiosulfato sódico 3:1 y solución salina saturada. La fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro, y a continuación el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol (15 ml) y se añadió metóxido sódico al 28 % (500 μ l) y la solución de reacción se agitó durante 2 horas. Se añadió ácido acético a la solución de reacción para neutralizarla, y a continuación se evaporó hasta sequedad a presión reducida. El residuo se purificó con cromatografía en columna sobre gel de sílice (24 x 240 mm, 10 % de metanol-cloroformo), y a continuación se recristalizó en acetona-hexano para dar un cristal incoloro (383 mg).
 10 RMN ¹H (400 MHz, Metanol-d₄) δ = 0,73 (s, 3H, 18-CH₃), 0,95 (s, 3H, 19-CH₃), 3,26 (t, 1H, J = 8,6 Hz, 17 α -H), 3,32 (s, 3H, -OCH₃), 3,45-3,51 (m a, 3H, H-2', H-3', H-5'), 3,71 (s, 1H, H-6'a), 3,73 (d, 1H, H-6'b), 3,74 (m, 1H, 3 β -H), 3,81 (d, 1H, H-4'), 4,33 (d, 1H, H-1', J_{1,2'} = 7,5 Hz). ESI-HR-MS Calculado para C₂₆H₄₄O₇-H: m/z 467,3014 [M-H]⁻.
 20 Encontrado m/z 451,3026; p.f. 197-199 °C.

Solución de ensayo de reacción

- 25 solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 8,5)
 MgCl₂ 10 mM
 tio-NAD 6 mM
 NADH 1 mM
 β -D-galactósido de 3 α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano 0,2 mM
 20 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra

5, 10, 25, 50, 100, y 250 pg/ml de β -galactosidasa (concentración final: 2,5, 5, 12,5, 25, 50 y 125 pg/ml)

Método de ensayo

- A un pocillo de microplaca de fondo plano, se añadieron 50 μ l de una solución tampón de fosfato (pH 8,5) que contenía la sustancia patrón (β -galactosidasa) en un intervalo de 0 a 250 pg/ml, y posteriormente, se añadieron a cada pocillo 50 μ l de la solución de ensayo de reacción B, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 120 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 120 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 14.

- 45 <Ejemplo 9> Ensayo de β -galactosidasa mediante método en dos etapas usando β -D-galactósido de 3 α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano

Solución de ensayo de reacción A

- 50 solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,5)
 MgCl₂ 4 mM
 β -D-galactósido de 3 α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano 0,1 mM

Solución de ensayo de reacción B

- 55 solución tampón de pirofosfato 0,1 M (pH 9,8)
 tio-NAD 1,2 mM
 NADH 1 mM
 40 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra

1, 4, 10, 40, 100 y 200 pg/ml de β -galactosidasa (concentración final: 0,5, 2, 5, 20, 50 y 100 pg/ml)

Método de ensayo

A un pocillo de microplaca de fondo plano, se añadieron 25 µl de una solución tampón de fosfato (pH 7,5) que contenía la sustancia patrón (β-galactosidasa) en un intervalo de 0 a 200 pg/ml, y posteriormente, se añadieron 25 µl de la solución de ensayo de reacción A al pocillo, respectivamente. La solución de reacción se mezcló, y la microplaca se incubó a 37 °C durante 60 minutos. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de la solución de ensayo de reacción B, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 30 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 30 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 15.

A continuación se describen algunos ejemplos de mediciones de Pumilio usando β-D-galactósido de androsterona. Sin embargo, no hay ningún anticuerpo que tenga reactividad específica frente a antígeno y está directamente marcado con β-galactosidasa, y de ese modo se intenta el método de Estreptoavidina Biotina Marcada (LSAB).

Ejemplo de Referencia 6

Fabricación de anticuerpo marcado con biotina

Se preparó un anticuerpo marcado con biotina a partir de un kit de marcaje con biotina (DOJINDO LABORATORIES) usando 50 µg del F(ab')₂ obtenido en el Ejemplo de Referencia 1.

<Ejemplo 10> Ensayo de Pumilio mediante método en una etapa usando β-D-galactósido de 5β-androsterona

Solución de ensayo de reacción

solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,7)
MgCl₂ 5 mM
tio-NAD 1,2 mM
NADH 0,8 mM
β-D-galactósido de 5β-androstano 0,05 mM
20 U/ml de 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra

0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1 y 2,5 ng/ml de Pumilio

Método de ensayo

A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado con el método del Ejemplo de Referencia 5, se añadieron 50 µl de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 2,5 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se añadieron 50 µl de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio marcado con biotina preparado en el método del Ejemplo de Referencia 6 en una concentración de aproximadamente 0,1 µg/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se añadieron 50 µl de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía β-galactosidasa marcada con estreptoavidina (F. Hoffmann-La Roche Ltd) en una concentración de 0,1 U conjugado/ml, y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se lavó además con TBS. A continuación, a cada pocillo, se añadieron 50 µl de la solución de ensayo de reacción, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 60 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 60 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 16.

<Ejemplo 11> Ensayo de Pumilio mediante método en dos etapas usando β-D-galactósido de 5β-androsterona

Solución de ensayo de reacción A

solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,5)
MgCl₂ 0,1 mM
β-D-galactósido de 5β-androsterona 0,05 mM

Solución de ensayo de reacción B

solución tampón de pirofosfato 0,1 M (pH 9,0)
 tio-NAD 3 mM
 NADH 2 mM
 5 40 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra

0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5 y 5 ng/ml de Pumilio

Método de ensayo

A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado con el método del Ejemplo de Referencia 5, se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 5 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio marcado con biotina preparado con el método del Ejemplo de Referencia 6 en una concentración de aproximadamente 0,1 μ g/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía β -galactosidasa marcada con estreptoavidina (F. Hoffmann-La Roche Ltd) en una concentración de 0,1 U conjugado/ml, y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se lavó además con TBS. A continuación, a cada pocillo, se añadieron 50 μ l de la solución de ensayo de reacción A, respectivamente, y la microplaca se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron al pocillo 50 μ l de la solución de ensayo de reacción B, y la absorbancia se midió durante 30 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 30 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 17.

<Ejemplo 12> Ensayo de Pumilio mediante método en una etapa usando β -D-galactósido de 3 α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano

Solución de ensayo de reacción

solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 8,5)
 tio-NAD 1,2 mM
 NADH 0,8 mM
 40 β -D-galactósido de 3 α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano 0,05 mM
 20 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Muestra

0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 y 10 ng/ml de Pumilio

Método de ensayo

A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado con el método del Ejemplo de Referencia 5, se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 10 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio marcado con biotina preparado con el método del Ejemplo de Referencia 6 en una concentración de aproximadamente 0,1 μ g/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía β -galactosidasa marcada con Estreptoavidina (F. Hoffmann-La Roche Ltd) en una concentración de 0,1 U conjugado/ml, y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se lavó además con TBS. A continuación, a cada pocillo, se añadieron 50 μ l de la solución de ensayo de reacción, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 60 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 60 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se

muestra en la Figura 18.

<Ejemplo 13> Ensayo de Pumilio mediante método en dos etapas usando β -D-galactósido de 3α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano

5

Solución de ensayo de reacción A

solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,0)
 β -D-galactósido de 3α -hidroxi-17 β -metoxi-5 β -androstano 0,05 mM

10

Solución de ensayo de reacción B

solución tampón de pirofosfato 0,1 M (pH 9,0)
 tio-NAD 2,4 mM
 NADH 2 mM
 40 U/ml de 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

15

Muestra

20 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 ng/ml de Pumilio

Método de ensayo

25 A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado con el método del Ejemplo de Referencia 5, se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 10 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio marcado con biotina preparado con el método del Ejemplo de Referencia 6 en una concentración de aproximadamente 0,3 μ g/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía β -galactosidasa marcada con estreptoavidina (F. Hoffmann-La Roche Ltd) en una concentración de 0,1 U conjugado/ml, y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %, y se lavó además con TBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 μ l de la solución de ensayo de reacción A, respectivamente, y la microplaca se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Posteriormente, al pocillo, se añadieron 50 μ l de solución de ensayo de reacción B, y la absorbancia se midió durante 30 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 30 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 19.

30

35

40

45 <Ejemplo de Referencia 7> Ensayo de Pumilio usando fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP)

Solución de ensayo de reacción

solución tampón de glicina 0,1 M (pH 10,3)
 MgCl₂ 1 mM
 ZnCl₂ 1 mM
 1 mg/ml de p-NPP

50

Muestra de ensayo

55 0, 1, 2,5, 5, 10 y 25 ng/ml de Pumilio

Método de ensayo

60 A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado con el método del Ejemplo de Referencia 3, se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 25 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación la microplaca se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Tween 20 al 0,05 %. Se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio marcado con ALP preparado con el método del Ejemplo de Referencia en una concentración de 1 μ g/ml, y la microplaca se agitó durante 1 hora. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación la microplaca se lavó con TBS (pH

65

7,5) que contenía Tween 20 al 0,05 %. Se añadieron 100 µl de la solución de ensayo de reacción a cada pocillo, y la absorbancia se midió durante 30 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 30 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 20.

<Ejemplo de Referencia 8> Ensayo de β-galactosidasa usando β-D-galactopiranosido de o-nitrofenilo (ONPG)

Solución de ensayo de reacción

solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,3)
 2-mercaptoetanol 0,2 mM
 MgCl₂ 1 mM
 ONPG 10 mM

Muestra de ensayo

2, 10, 20 y 50 ng/ml de β-galactosidasa (concentración final: 1, 5, 10 y 25 ng/ml)

Método de ensayo

A un pocillo de microplaca de fondo plano, se añadieron 50 µl de una solución tampón de fosfato (pH 7,3) que contenía la sustancia patrón (β-galactosidasa) en un intervalo de 0 a 25 ng/ml, y posteriormente, al pocillo, se añadieron 50 µl de la solución de ensayo de reacción, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 60 minutos usando un filtro de 415 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 60 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 21.

Método de cálculo del límite de detección y el límite de cuantificación

La cantidad del cambio de absorbancia de cada resultado de medición se representa con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón, y solo las concentraciones en paralelo en la línea recta se extraen para preparar una curva de ajuste. A continuación, se calcula la desviación típica del blanco (sin incluir la sustancia patrón; n ≥ 3), y el valor 3 veces y el valor 10 veces de la misma se dividen por la pendiente de la curva de ajuste, y los valores numéricos obtenidos se toman como el límite de detección y el límite de cuantificación, respectivamente.

El límite de detección y el límite de cuantificación calculados de cada resultado de experimento se resumen en las Tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2

Límite de detección y límite de cuantificación de fosfatasa alcalina y β-Galactosidasa

Ensayo de ALP y β-Gal (unidades: mol)				
Enzima	Sustrato	Método	Límite de detección	Límite de cuantificación
ALP	17-OMe 5β-A3P	Una etapa	3,25 x 10 ⁻¹⁸	1,08 x 10 ⁻¹⁷
		Dos etapas	8,19 x 10 ⁻²⁰	2,73 x 10 ⁻¹⁹
β-Gal	5α-AG	Dos etapas	3,89 x 10 ⁻¹⁹	1,3 x 10 ⁻¹⁸
		5β-AG	Una etapa	3,31 x 10 ⁻¹⁹
	Dos etapas		7,48 x 10 ⁻²⁰	2,49 x 10 ⁻¹⁹
	17-OMe 5β-AG	Una etapa	3,21 x 10 ⁻¹⁹	1,07 x 10 ⁻¹⁸
		Dos etapas	1,09 x 10 ⁻¹⁹	3,64 x 10 ⁻¹⁹
	ONPG			4,5 x 10 ⁻¹⁷
4-MUG			9,76 x 10 ⁻¹⁸	3,25 x 10 ⁻¹⁷

Tabla 3

Límite de detección y límite de cuantificación de proteína Pumilio (sistema de β -Galactosidasa)
Ensayo ELISA (unidades: mol)

		Límite de detección	Límite de cuantificación
5 β -AG	Una etapa	$2,21 \times 10^{-17}$	$7,35 \times 10^{-17}$
	Dos etapas	$1,65 \times 10^{-17}$	$5,51 \times 10^{-17}$
17-OMe 5 β -AG	Una etapa	$3,24 \times 10^{-17}$	$1,08 \times 10^{-16}$
	Dos etapas	$3,17 \times 10^{-17}$	$1,06 \times 10^{-16}$
4-MUG		$2,07 \times 10^{-16}$	$6,91 \times 10^{-16}$

Tabla 4

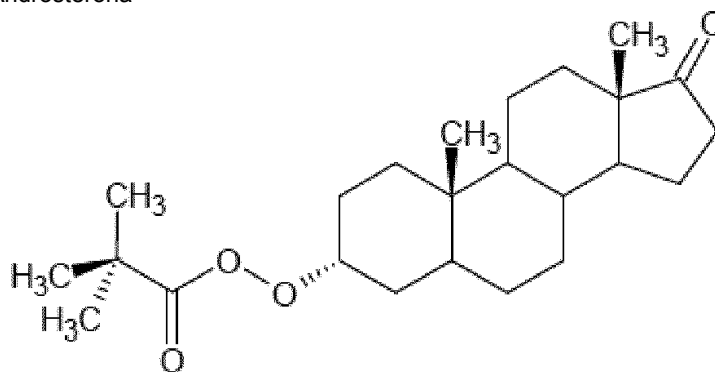
Límite de detección y límite de cuantificación de proteína Pumilio (sistema de fosfatasa alcalina)

Ensayo ELISA			
Sustrato		Límite de detección	Límite de cuantificación
5 α -A3P	Una etapa	$3,57 \times 10^{-14}$	$7,3 \times 10^{-14}$
	Dos etapas	$2,63 \times 10^{-16}$	$8,76 \times 10^{-16}$
5 β -A3P	Una etapa	$3,96 \times 10^{-15}$	$1,32 \times 10^{-14}$
	Dos etapas	$1,2 \times 10^{-16}$	4×10^{-16}
17-OMe 5 β -A3P	Una etapa	$4,0 \times 10^{-17}$	$1,3 \times 10^{-16}$
	Dos etapas	$2,45 \times 10^{-18}$	$8,17 \times 10^{-18}$
ρ -NPP		$3,97 \times 10^{-16}$	$1,32 \times 10^{-15}$

5 <Ejemplo 14>

Ensayo de peroxidasa de rábano mediante método en una etapa usando 3 α -terc-butil-peroxi-5 β -androsterona

3 α -terc-butil-peroxi-5 β -Androsterona



10

Síntesis de 3 α -terc-butil-peroxi-5 β -androsterona

15 Se disolvió 3 α -cloro-5 β -androsterona (100 mg) en una solución de diclorometano (15 ml), para preparar la solución de ensayo de reacción. A la presente solución, se añadió una solución de hidroperóxido de terc-butilo (30 mg) disuelto en una solución acuosa (15 ml) de hidróxido sódico al 20 %, y la solución de reacción se hizo reaccionar con agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. La fase orgánica se recogió de la solución de reacción, y se lavó con una solución acuosa de hidrogenocarbonato sódico saturado y solución salina saturada, secuencialmente. La fase orgánica se deshidrató con sulfato sódico anhidro, y a continuación el disolvente se retiró por destilación a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (24 x 240 mm, 10 % de metanol-cloroformo), y a continuación se obtuvieron 88 mg del presente compuesto. La identificación del presente compuesto se llevó a cabo mediante RMN ^1H , ESI-HR-MS y p.f. (punto de fusión).

20

Solución de ensayo de reacción

solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,0)
 MgCl₂ 10 mM
 tio-NAD 6 mM
 NADH 1 mM
 3 α -terc-butil-peroxi-5 β -androsterona 0,1 mM
 40 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

10 Muestra

5, 10, 25, 50, 100 y 250 pg/ml de peroxidasa de rábano (concentración final: 2,5, 5, 12,5, 25, 50 y 125 pg/ml)

15 Método de ensayo

A un pocillo de microplaca de fondo plano, se añadieron 50 μ l de una solución tampón de fosfato (pH 7,0) que contenía la sustancia patrón (peroxidasa de rábano) (denominada en lo sucesivo HRP) en un intervalo de 0 a 250 pg/ml, y posteriormente, al pocillo, se añadieron 50 μ l de la solución de ensayo de reacción, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 120 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 120 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 22.

<Ejemplo 15>

25

Ensayo de Pumilio mediante método en una etapa usando 3 α -terc-butil-peroxi-5 β -androsterona

Solución de ensayo de reacción

solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,0)
 MgCl₂ 10 mM
 tio-NAD 6 mM
 NADH 1 mM
 3 α -terc-butil-peroxi-5 β -androsterona 0,1 mM
 40 U/ml de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa

30 Muestra

0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1 y 2,5 ng/ml de Pumilio

40

Método de ensayo

A una microplaca inmovilizada con el anticuerpo policlonal de cobaya anti-Pumilio preparado con el método del Ejemplo de Referencia 5, se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía Pumilio purificado (sustancia patrón) en un intervalo de 0 a 2,5 ng/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %. Se añadieron 50 μ l de TBS (pH 7,5) que contenían una solución de BSA al 0,1 % que contenía el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Pumilio marcado con HRP en una concentración de aproximadamente 0,1 μ g/ml, y la microplaca se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución en el pocillo se retiró con succión, y a continuación el pocillo se lavó con TBS (pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,5 %. A continuación, a cada pocillo, se añadieron 50 μ l de la solución de ensayo de reacción, respectivamente, y la absorbancia se midió durante 60 minutos usando un filtro de 405 nm con un lector de microplaca (MTP-500 fabricado por CORONA CORPORATION) mientras se calentaba la microplaca a 37 °C. La cantidad del cambio de absorbancia durante 60 minutos se representó con respecto a las concentraciones de la sustancia patrón. La línea recta obtenida con buena dependencia con la concentración se muestra en la Figura 23.

55

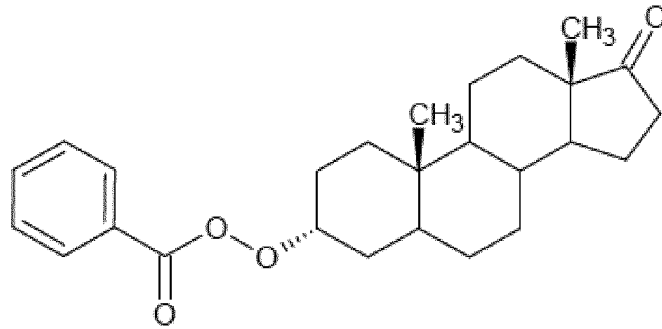
<Ejemplo de Referencia 9>

60 Síntesis de 3 α -benzoil-peroxi-5 β -androsterona y 3 α -acetil-peroxi-5 β -androsterona

El compuesto del título se obtuvo de forma similar a la síntesis de 3 α -terc-butil-peroxi-5 β -androsterona descrita en el Ejemplo 14 excepto en que se cambió hidroperóxido de terc-butilo por hidroperóxido de benzoilo o hidroperóxido de acetilo.

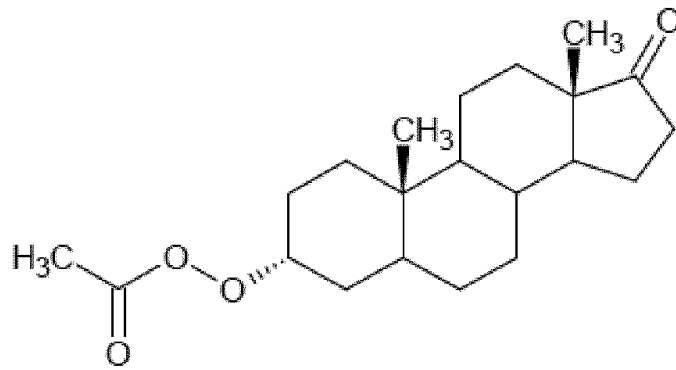
65

3 α -benzoil-peroxi-5 β -Androsterona



3α-acetil-peroxi-5β-Androsterona

5

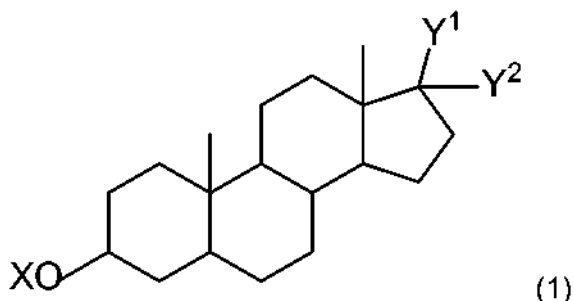


[Aplicabilidad industrial]

- 10 La presente invención se puede usar de forma adecuada en el campo del examen clínico o en el campo del examen alimentario que demanda una medición de elevada sensibilidad sencilla.

REIVINDICACIONES

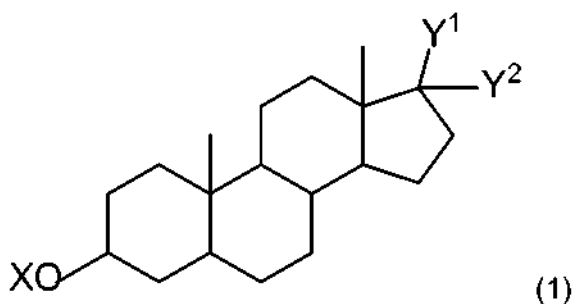
1. Un método para someter a ensayo la actividad enzimática usando un complejo anticuerpo-enzima, en el que se usa peroxidasa como una enzima del complejo anticuerpo-enzima y como un sustrato de la enzima se usa un derivado de androsterona representado por la siguiente fórmula (1),



en la que

- 10 X representa -O-CO-R (siempre que R represente un grupo alquilo C₁₋₆ o un grupo fenilo), Y¹ e Y² representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y¹ representa hidrógeno e Y² representa un grupo alcoxi C₁₋₆ o un grupo alquilo C₁₋₆ cuando se usa el derivado de androsterona representado por la fórmula (1) como un sustrato de peroxidasa, y
- 15 la cuantificación de un producto de la reacción enzimática se lleva a cabo mediante la producción de tio-NADH y/o tio-NADPH por reacción de ciclo enzimático usando NADH y/o NADPH, tio-NAD y/o tio-NADP, e hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD), y sometiendo a ensayo la cantidad de tio-NADH y/o de tio-NADPH producida, o midiendo el cambio del color por el tio-NADH y/o por el tio-NADPH producidos.

2. Un método para someter a ensayo una sonda de ácido nucleico usando una sonda de ácido nucleico marcada con enzima, en donde se usa peroxidasa como la enzima de la sonda de ácido nucleico marcada con enzima, y como un sustrato de la enzima se usa un derivado de androsterona representado por la siguiente fórmula (1),



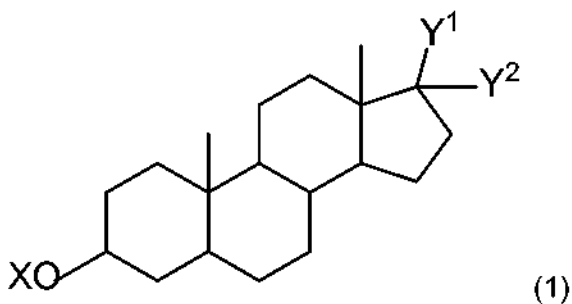
25 en la que

- X representa -O-CO-R (siempre que R represente un grupo alquilo C₁₋₆ o un grupo fenilo), Y¹ e Y² representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y¹ representa hidrógeno e Y² representa un grupo alcoxi C₁₋₆ o un grupo alquilo C₁₋₆ cuando se usa como un sustrato de peroxidasa el derivado de androsterona representado por la fórmula (1), y
- 30 la cuantificación de un producto de reacción de la reacción enzimática se lleva a cabo mediante la producción de tio-NADH y/o tio-NADPH por reacción de ciclo enzimático usando NADH y/o NADPH, tio-NAD y/o tio-NADP, e hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD), y sometiendo a ensayo la cantidad de tio-NADH y/o de tio-NADPH producida, o midiendo el cambio del color por tio-NADH y/o por tio-NADPH producidos.

- 35 3. Un kit para inmunoensayo enzimático que comprende los siguientes reactivos (1) a (5):

- (1) peroxidasa marcada con un anticuerpo específico frente a un antígeno de la proteína diana,
 (2) un derivado de androsterona representado por la fórmula (1), que es un sustrato de la enzima descrita anteriormente

40

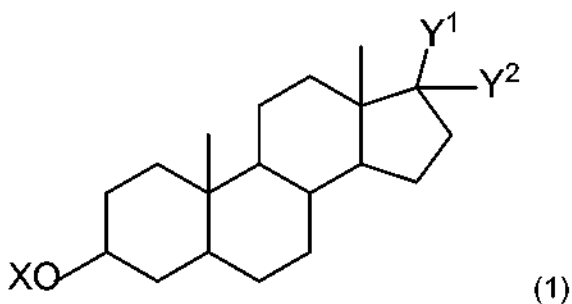


5 en la que X representa -O-CO-R (siempre que R represente un grupo alquilo C₁₋₆ o un grupo fenilo), Y¹ e Y² representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y¹ representa hidrógeno e Y² representa un grupo alcoxi C₁₋₆ o un grupo alquilo C₁₋₆,
 (3) hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD),
 (4) NADH y/o NADPH, y
 (5) tio-NAD y/o tio-NADP.

10 4. Un kit para someter a ensayo una sonda de ácido nucleico que comprende los siguientes reactivos (1) a (5):

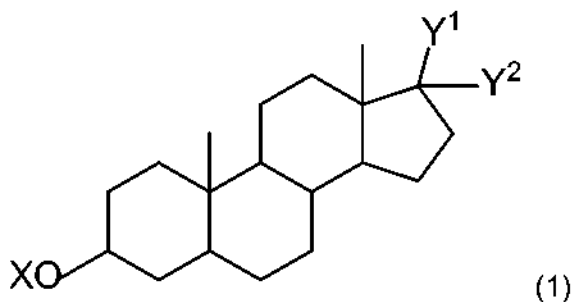
(1) peroxidasa marcada con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico diana,
 (2) un derivado de androsterona representado por la fórmula (1), que es un sustrato de la enzima descrita anteriormente

15



20 en la que X representa -O-CO-R (siempre que R represente un grupo alquilo C₁₋₆ o un grupo fenilo), Y¹ e Y² representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y¹ representa hidrógeno e Y² representa un grupo alcoxi C₁₋₆ o un grupo alquilo C₁₋₆,
 (3) hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD),
 (4) NADH y/o NADPH, y
 (5) tio-NAD y/o tio-NADP.

25 5. Derivado de androsterona representado por la siguiente fórmula (1):



30 en la que X representa -O-CO-R, R representa un grupo alquilo C₁₋₆ o un grupo fenilo, e Y¹ e Y² representan conjuntamente un átomo de oxígeno, o Y¹ representa hidrógeno e Y² representa un grupo alcoxi C₁₋₆ o un grupo alquilo C₁₋₆.

Fig. 1

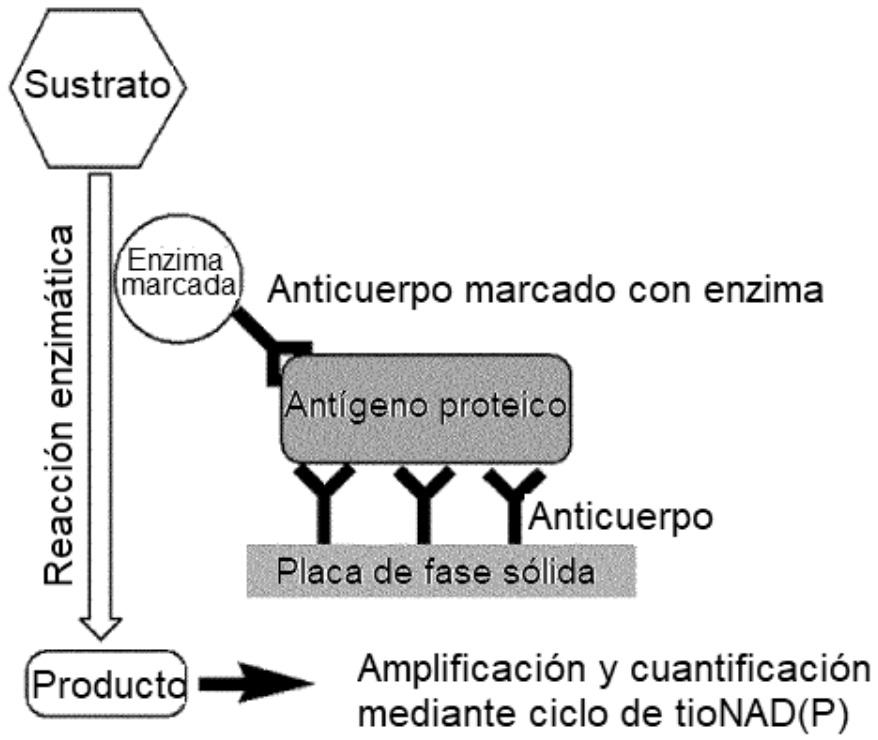


Fig. 2

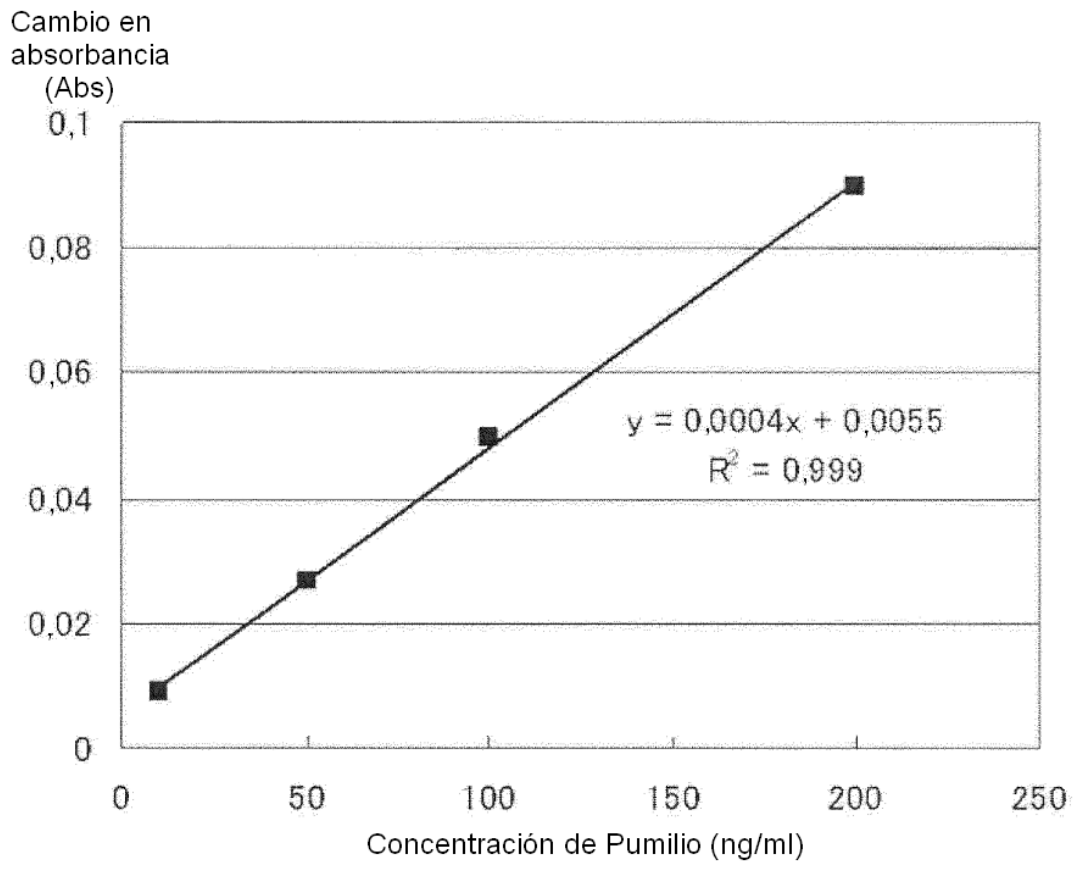


Fig. 3

Cambio en
absorbancia
(Abs)

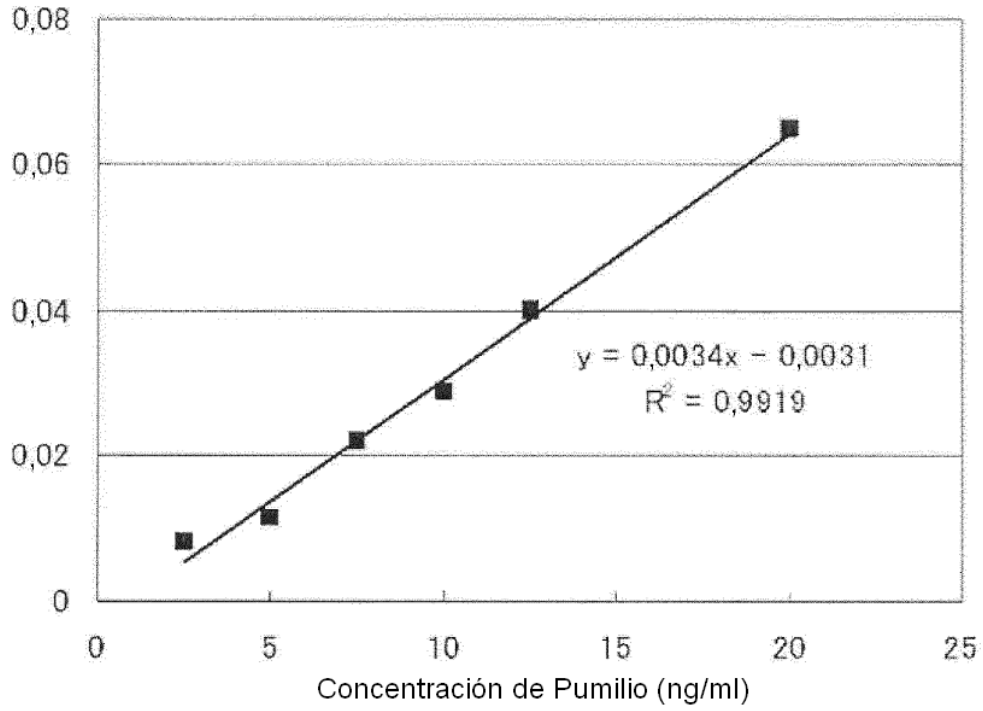


Fig. 4

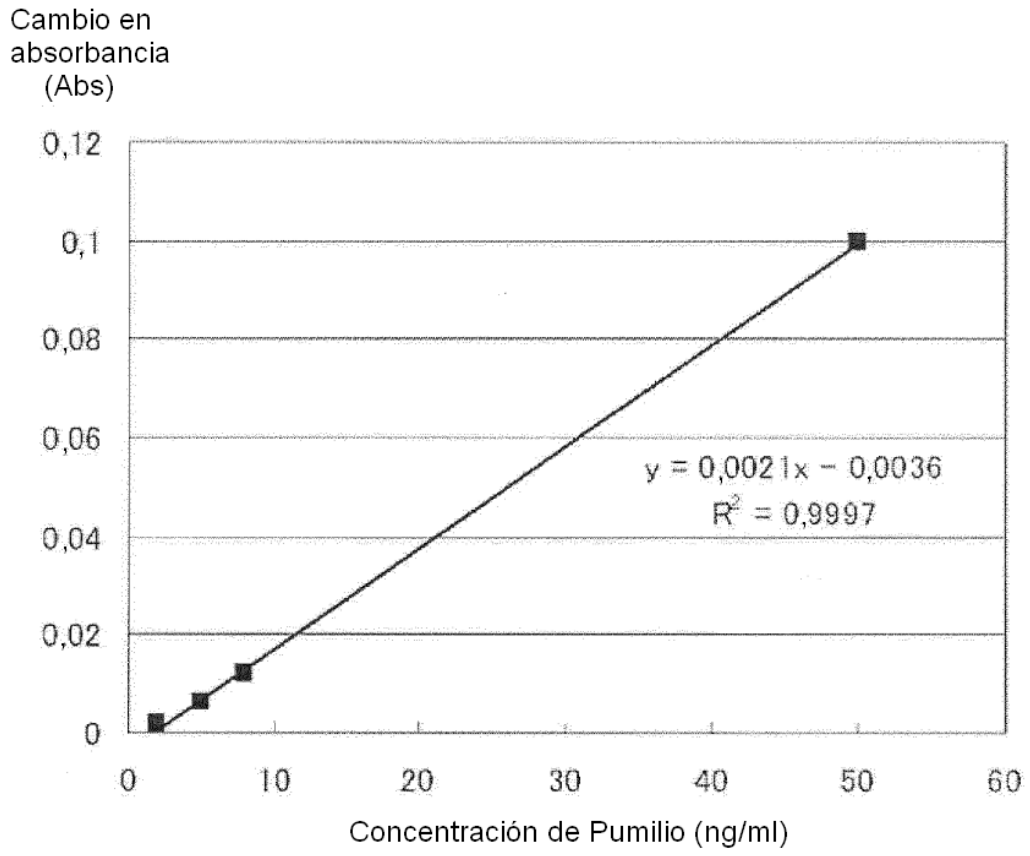


Fig. 5

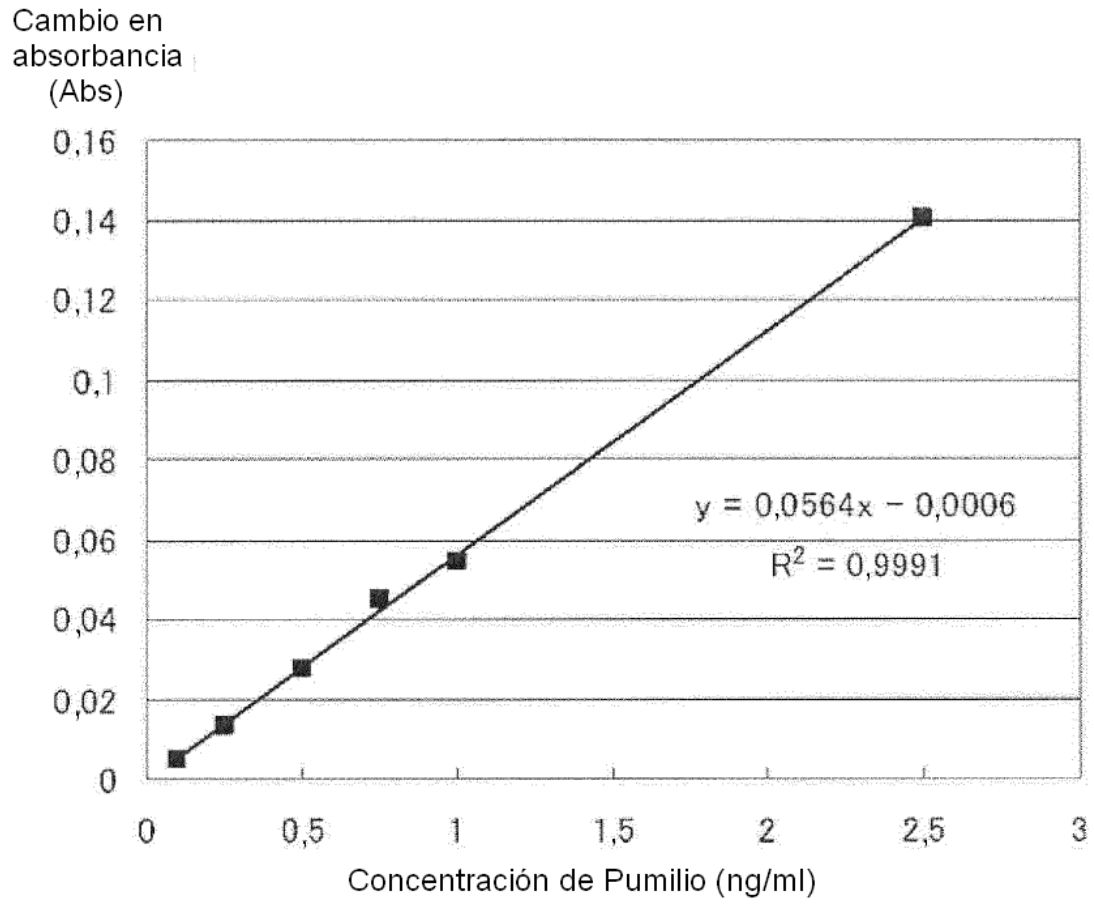
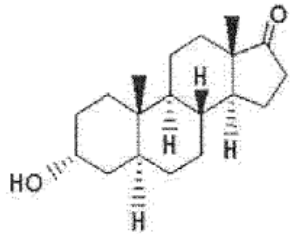
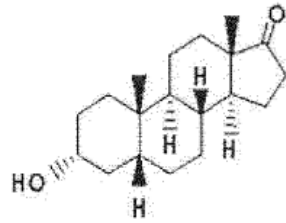


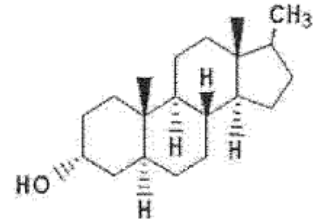
Fig. 6



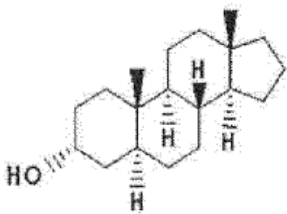
5α-Androsterona



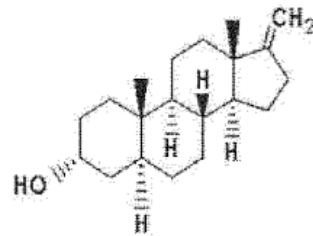
5β-Androsterona



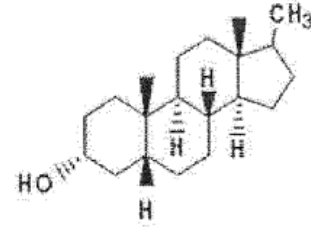
3α-Hidroxi-17β-metil-5α-Androstano (5α-17-CH₃)



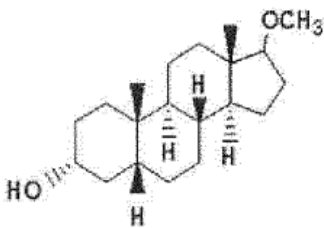
3α-Hidroxi-5α-Androstano (5α-17-desoxo)



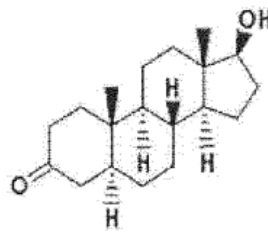
3α-Hidroxi-17-metilen-5α-Androstano (5α-17-CH₂)



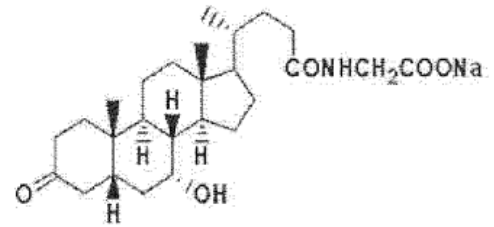
3α-Hidroxi-17β-metil-5β-Androstano (5β-17-OCH₃)



3α-Hidroxi-17β-metoxi-5β-Androstano (5β-17-OCH₃)



5α-Dihidrottestosterona (5α-DHT)



Glicoquenodesoxicolato sódico

Fig. 7

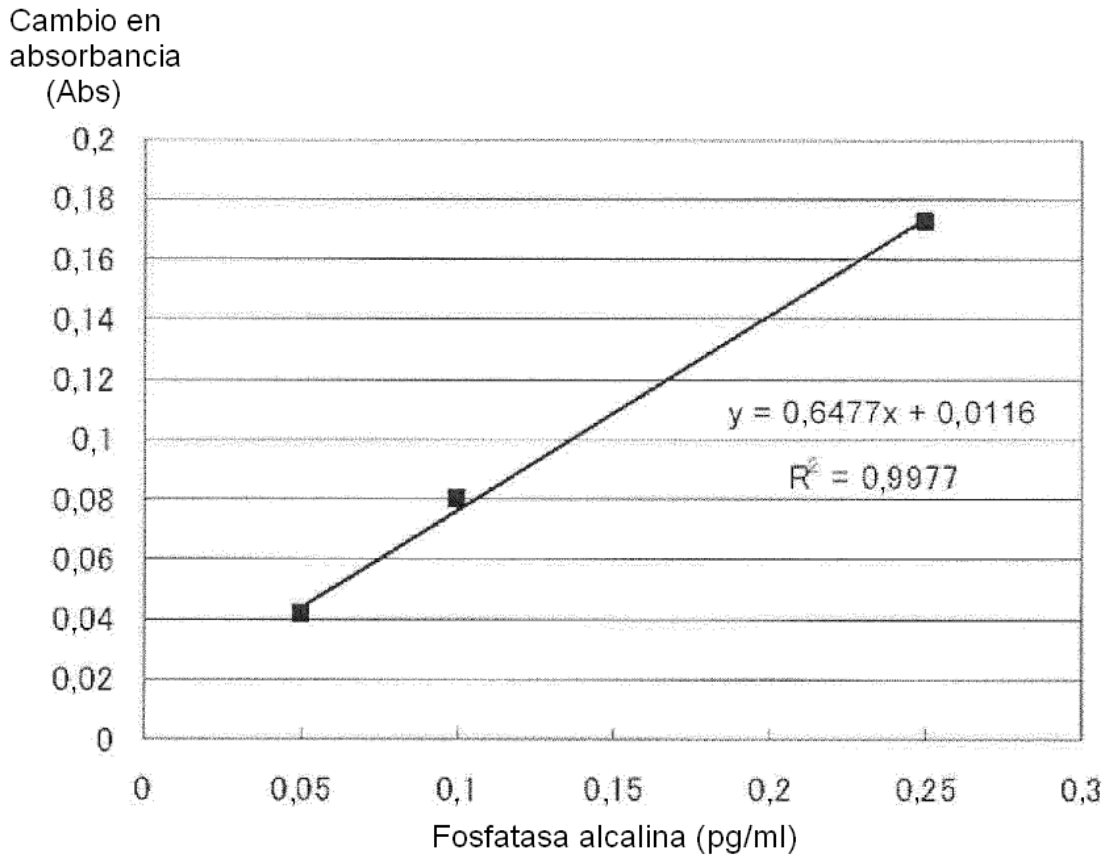


Fig. 8

Cambio en
absorbancia
(Abs)

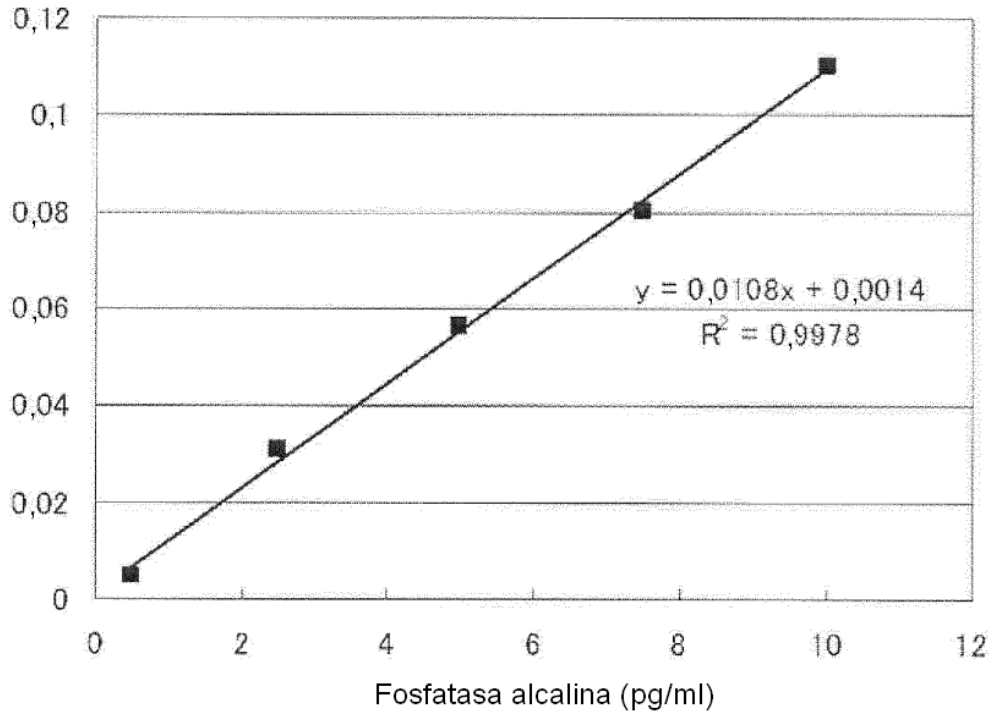


Fig. 9

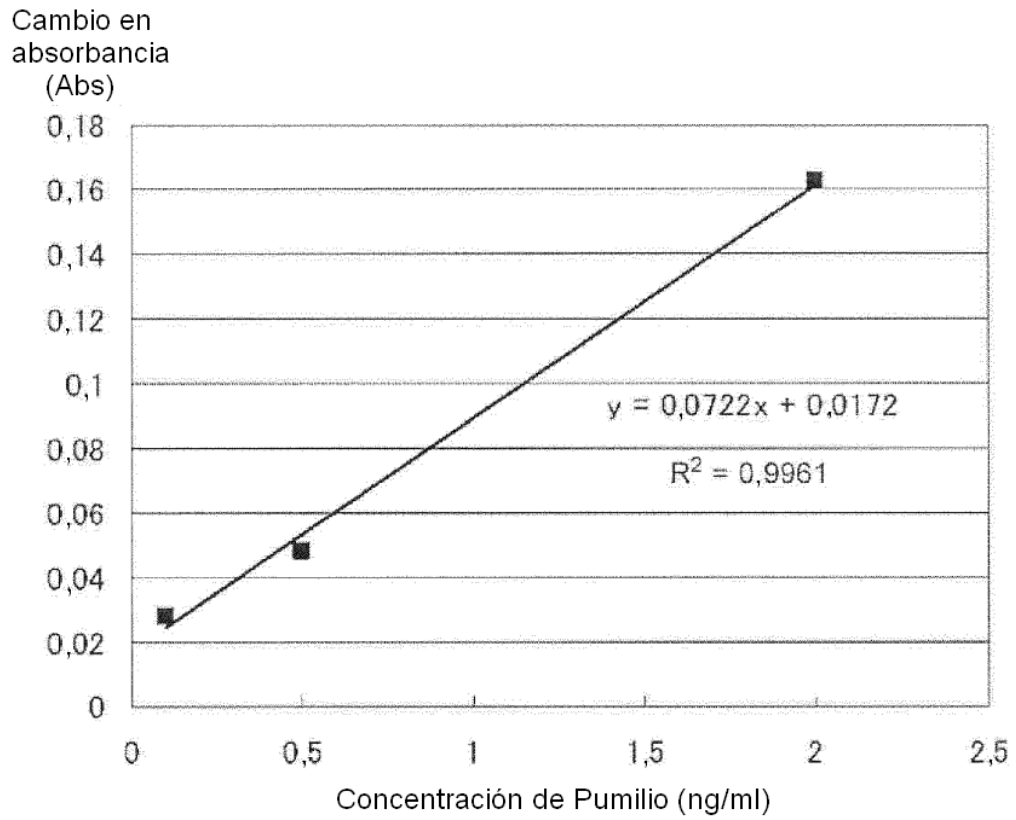


Fig. 10

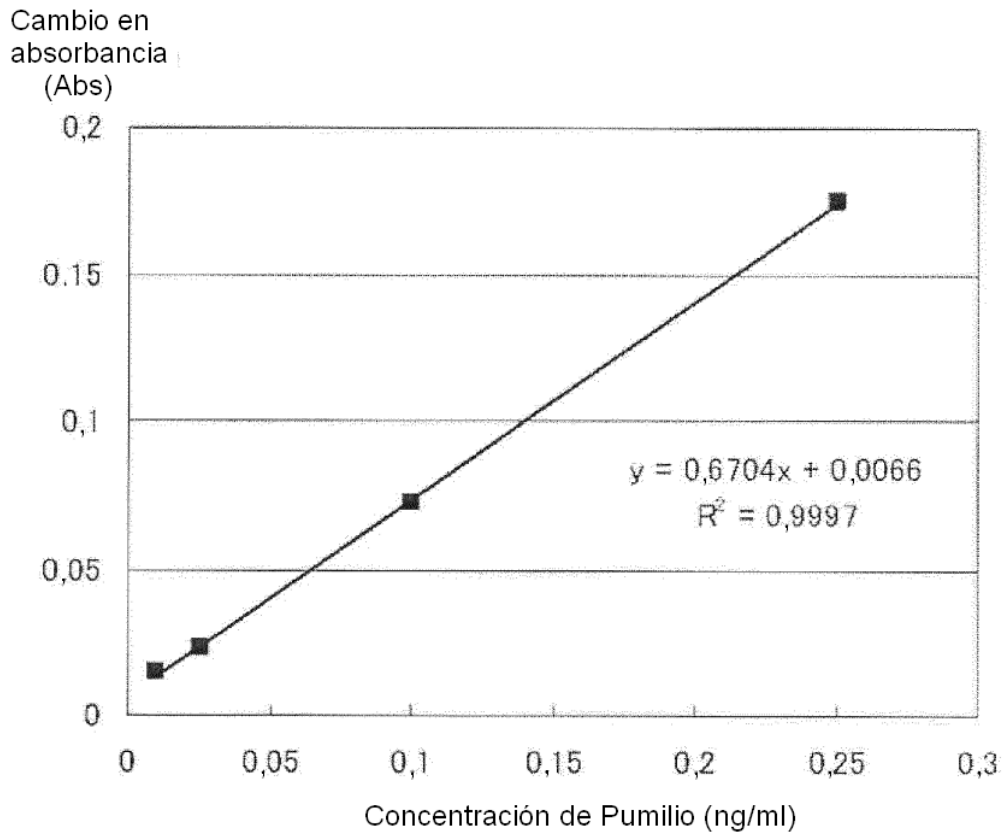


Fig. 11

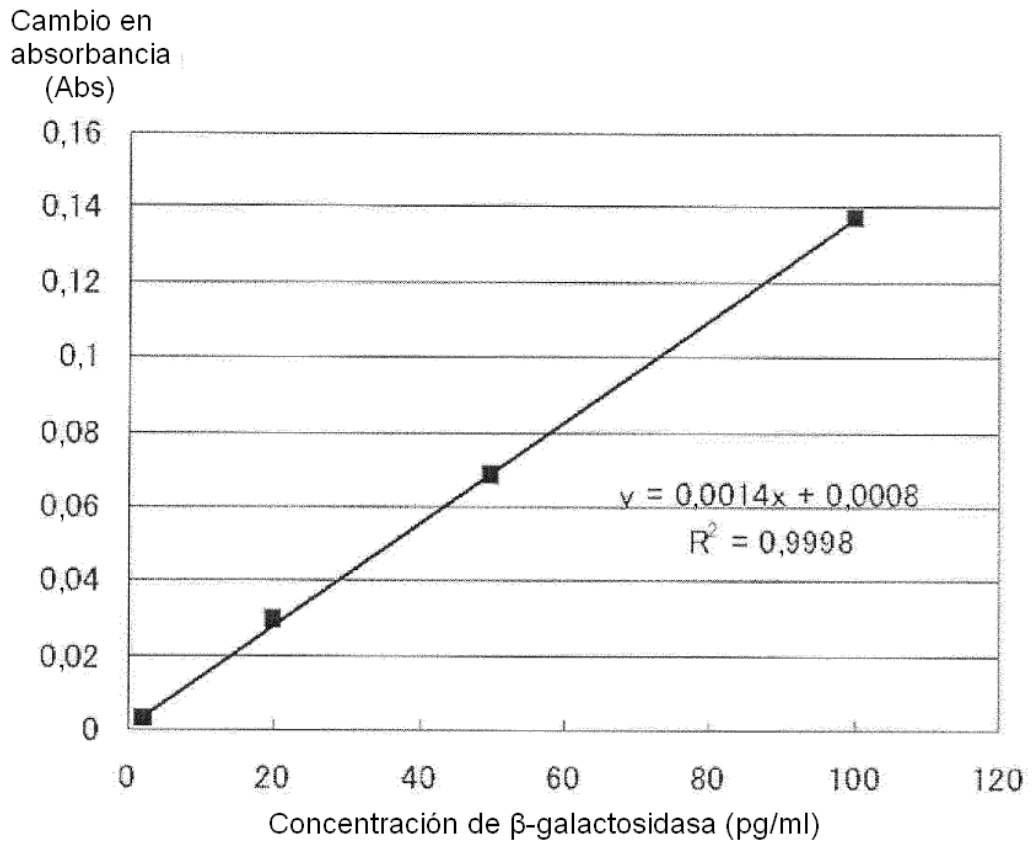


Fig. 12

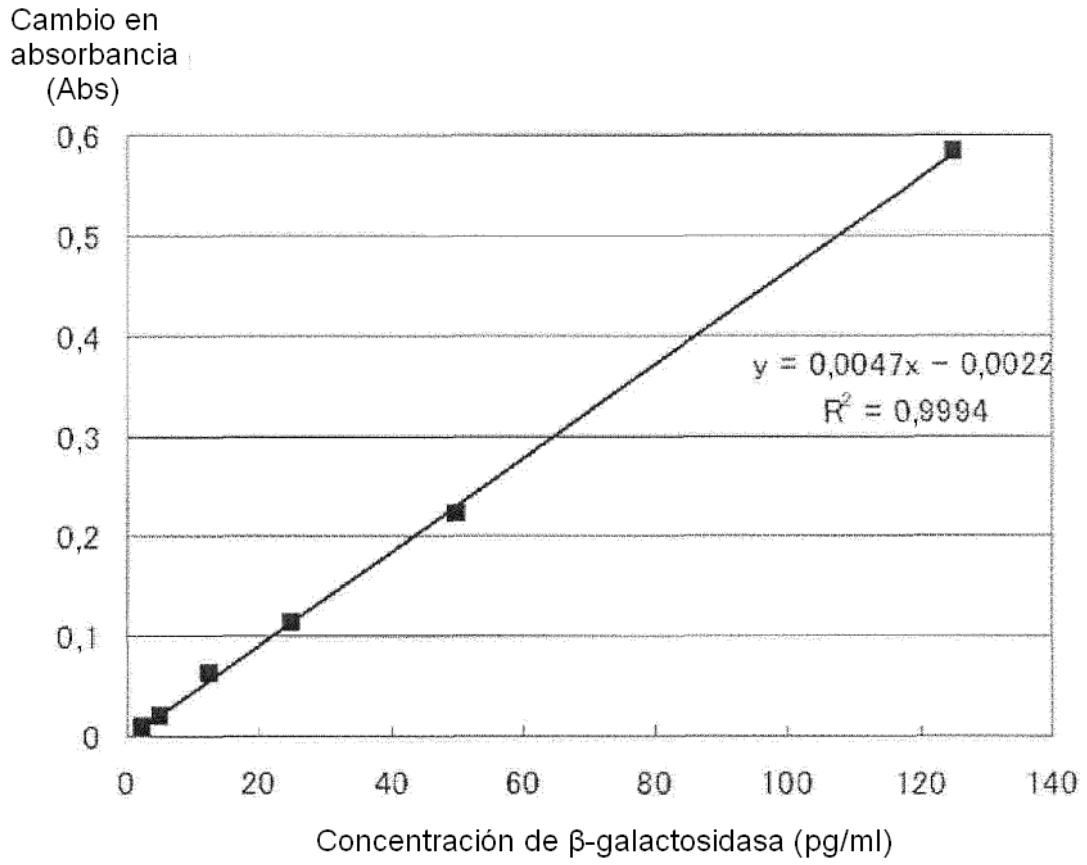


Fig. 13

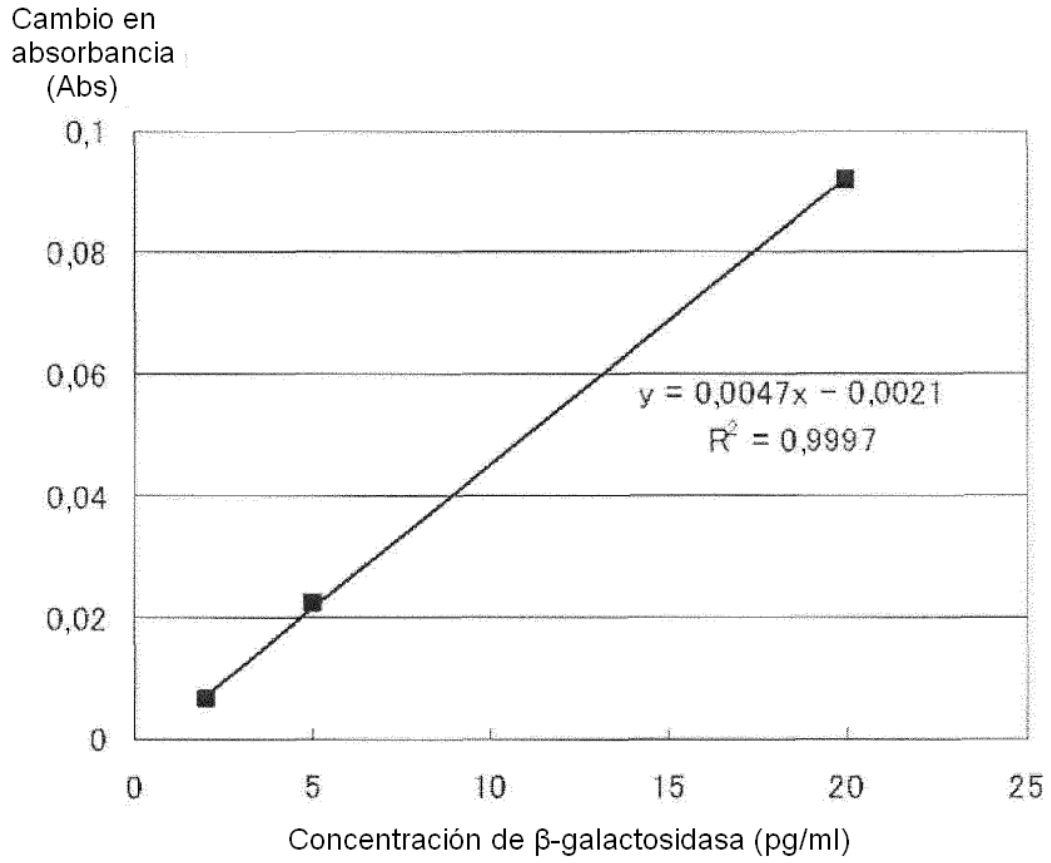


Fig. 14

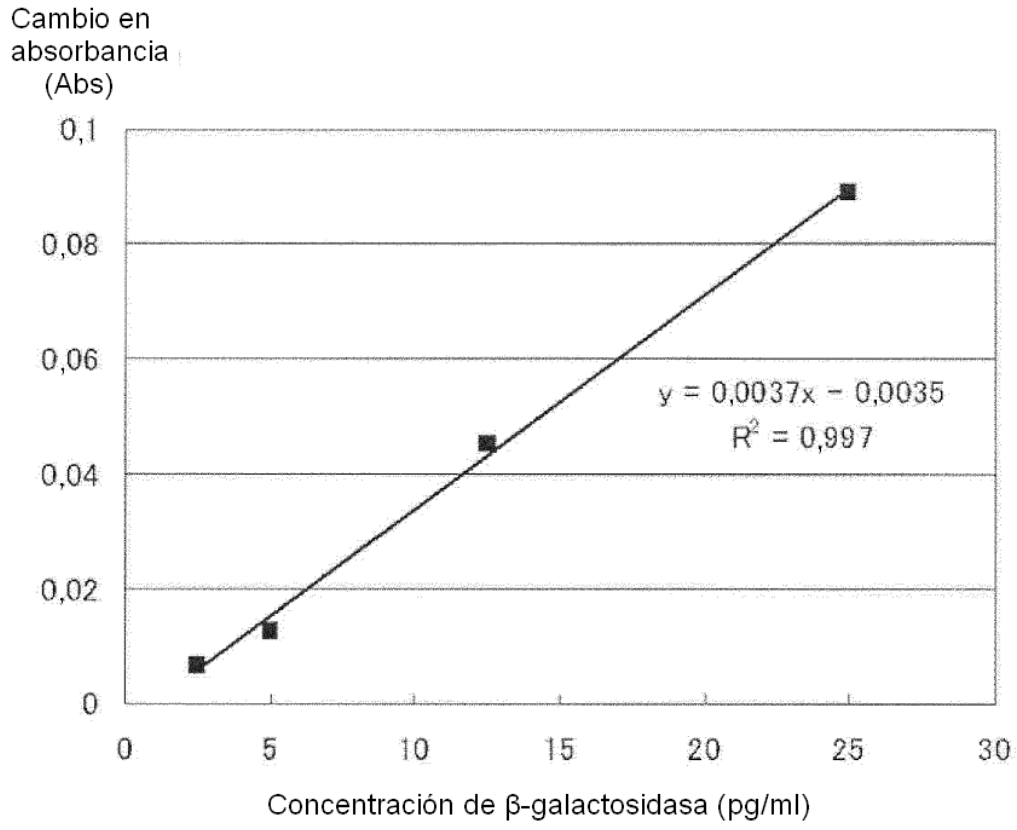


Fig. 15

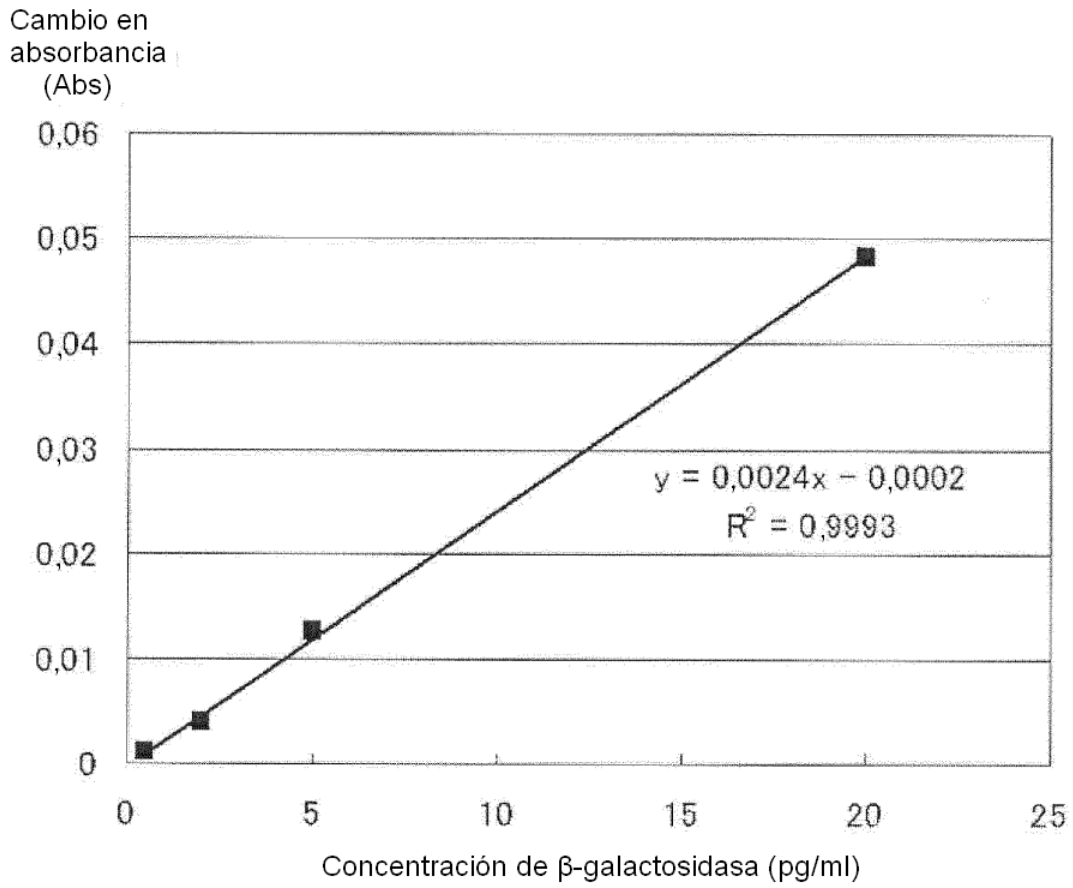


Fig. 16

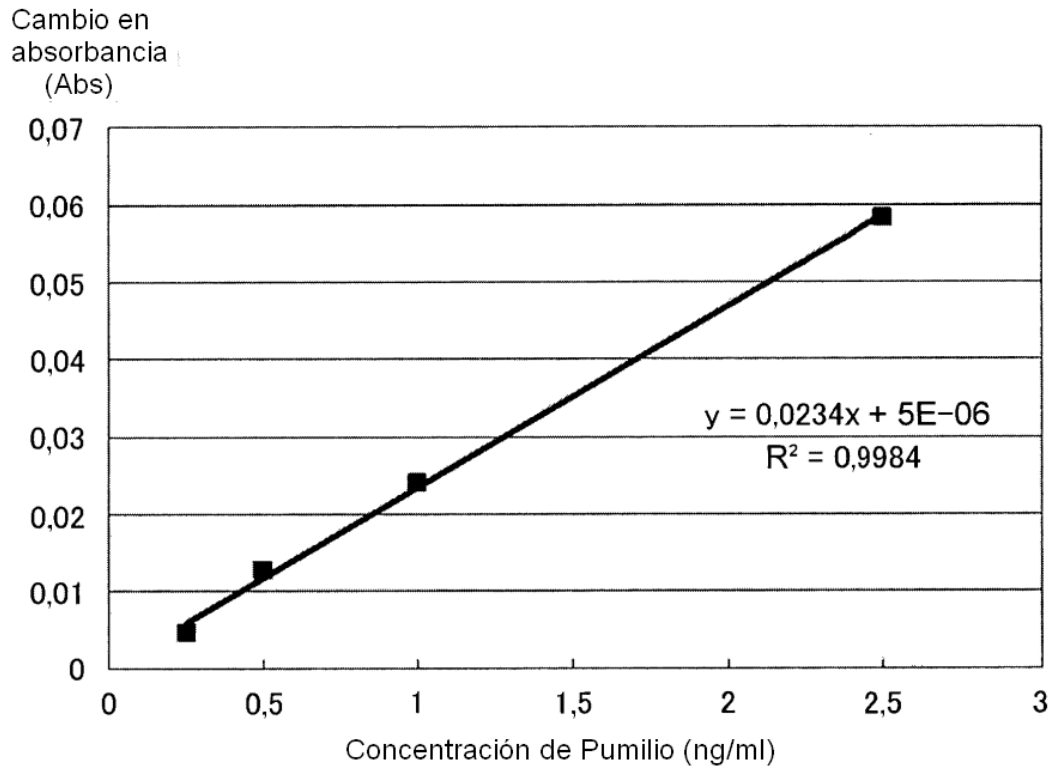


Fig. 17

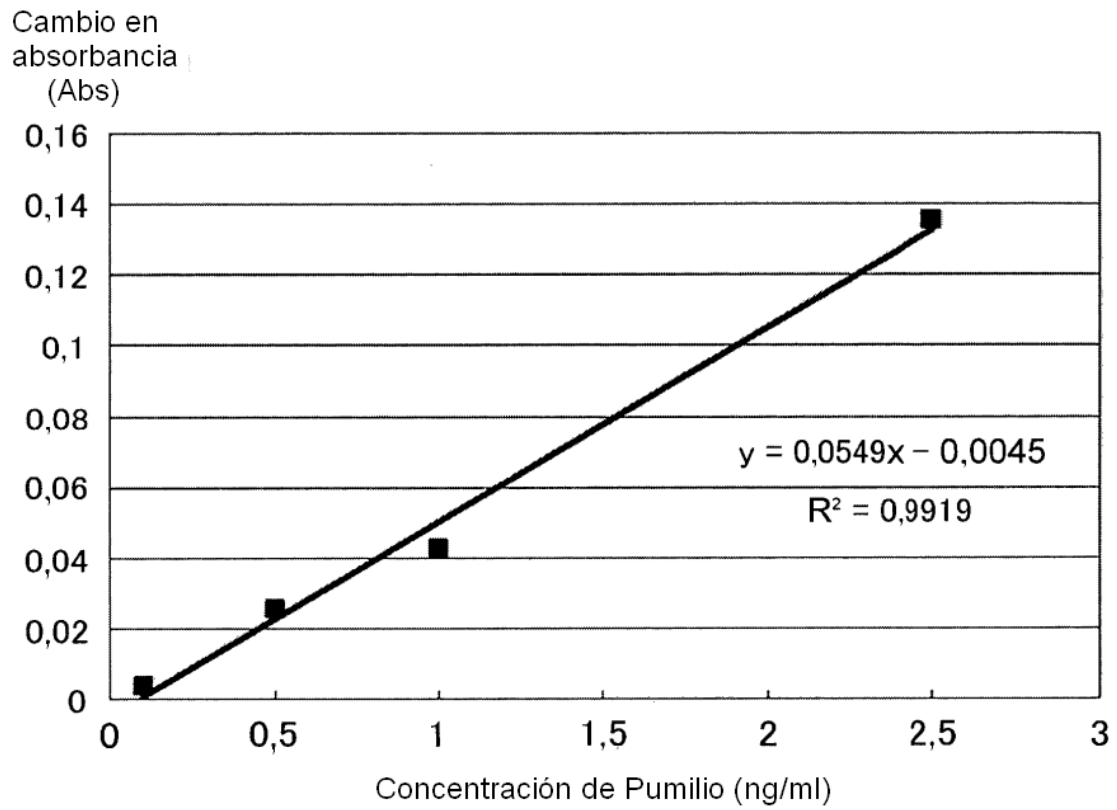


Fig. 18

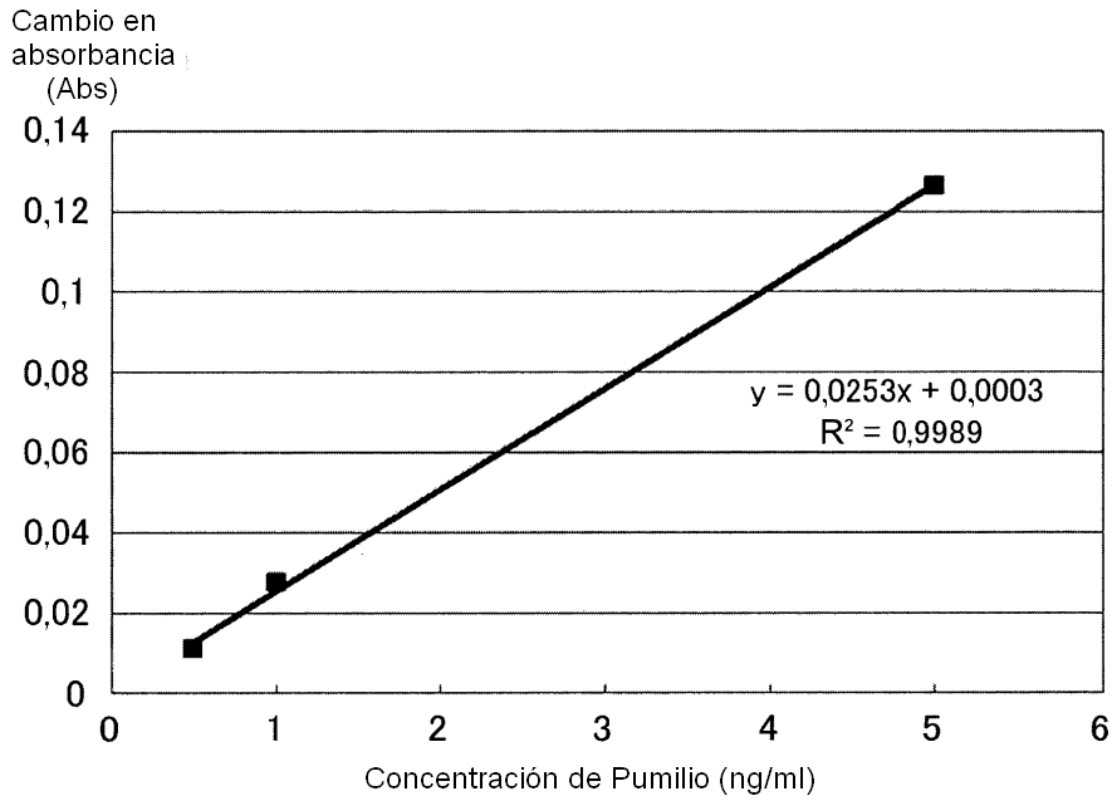


Fig. 19

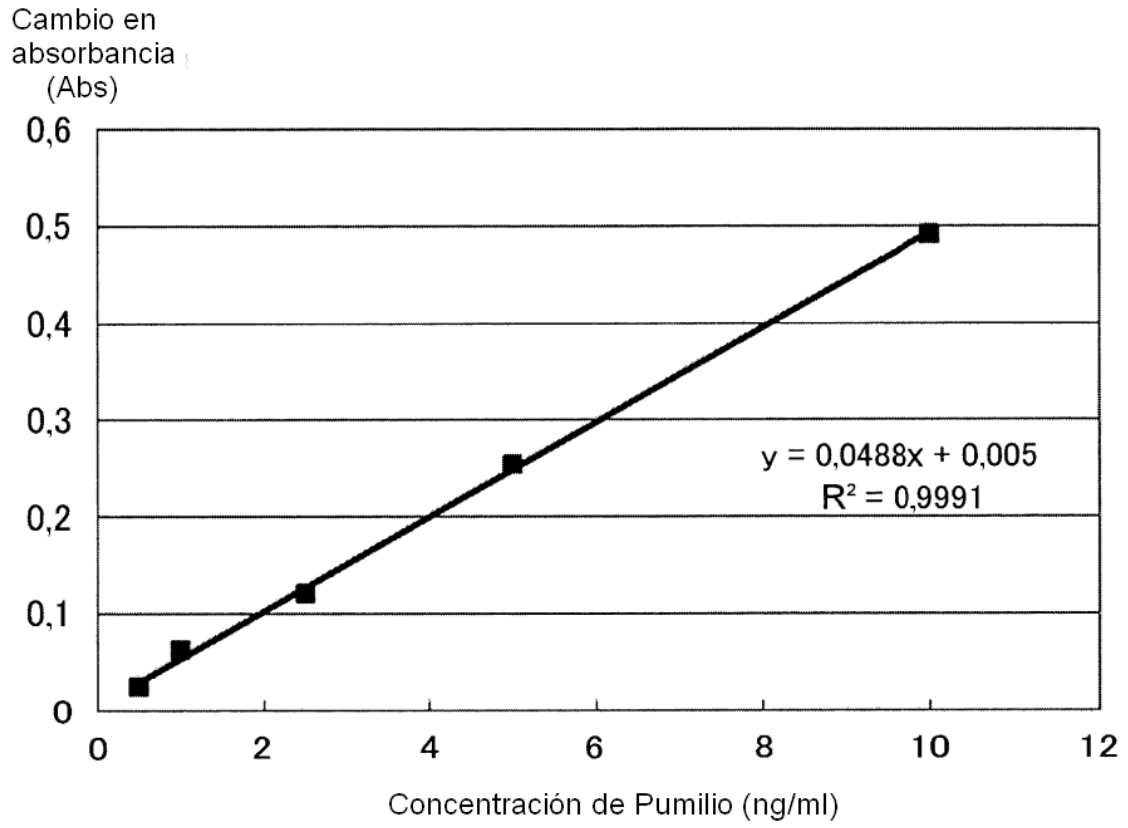


Fig. 20

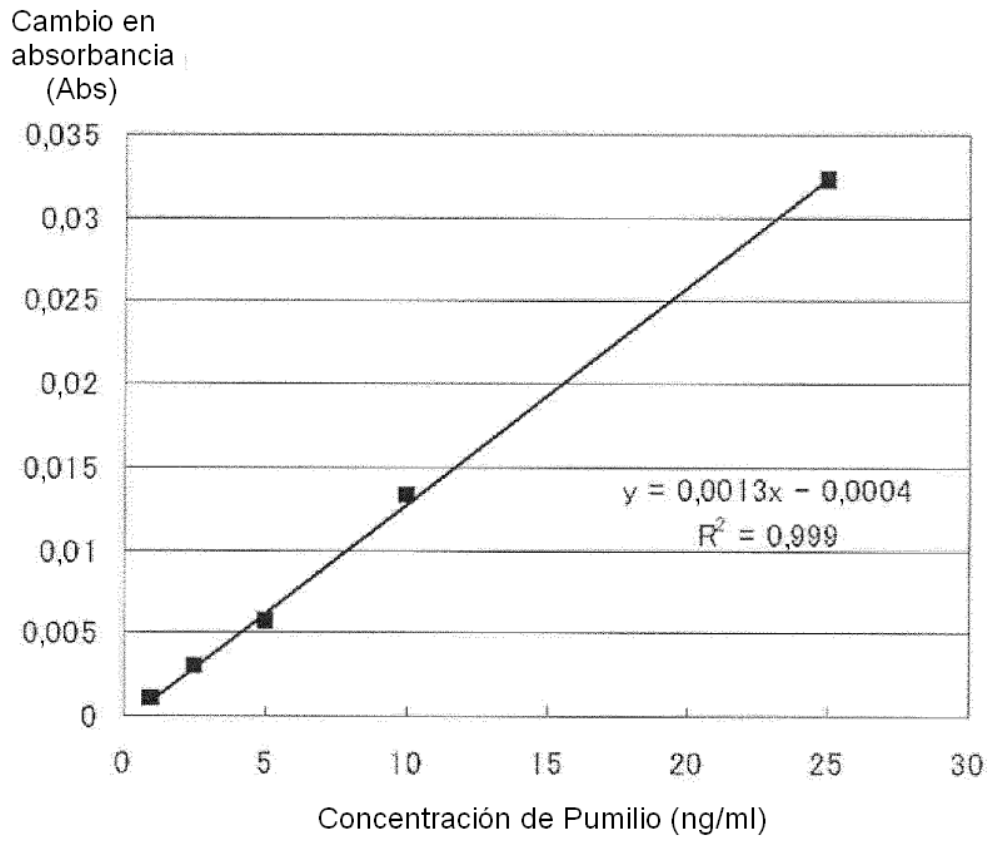


Fig. 21

Cambio en
absorbancia
(Abs)

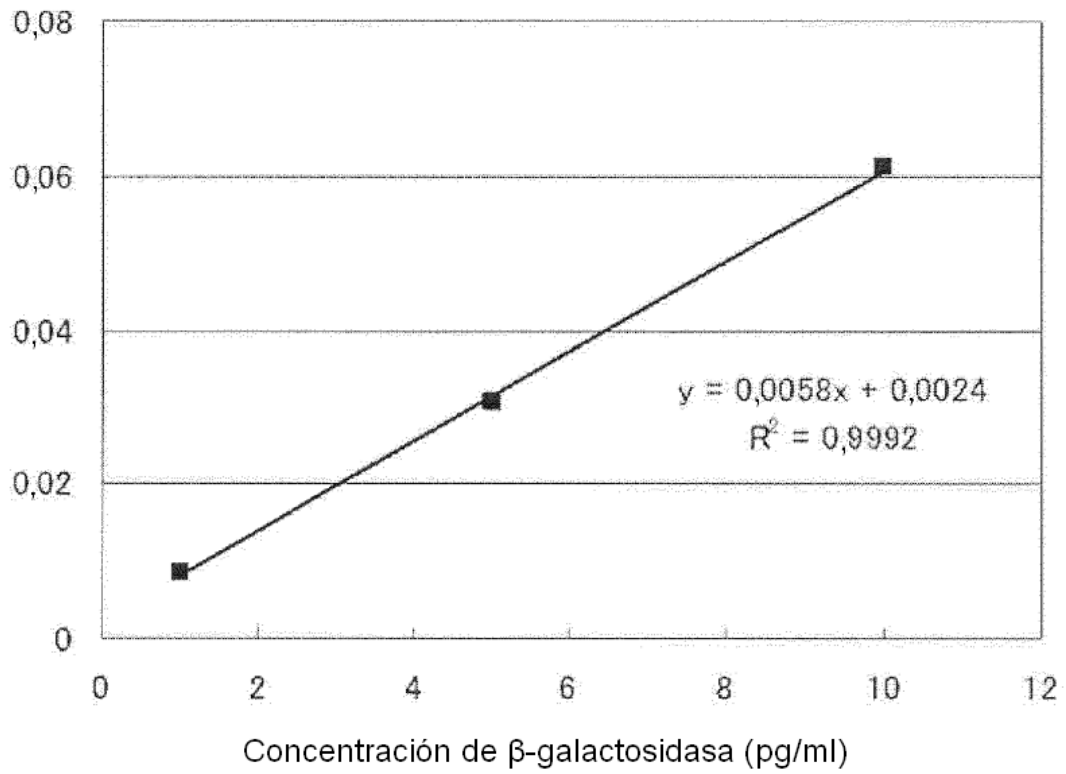


Fig. 22

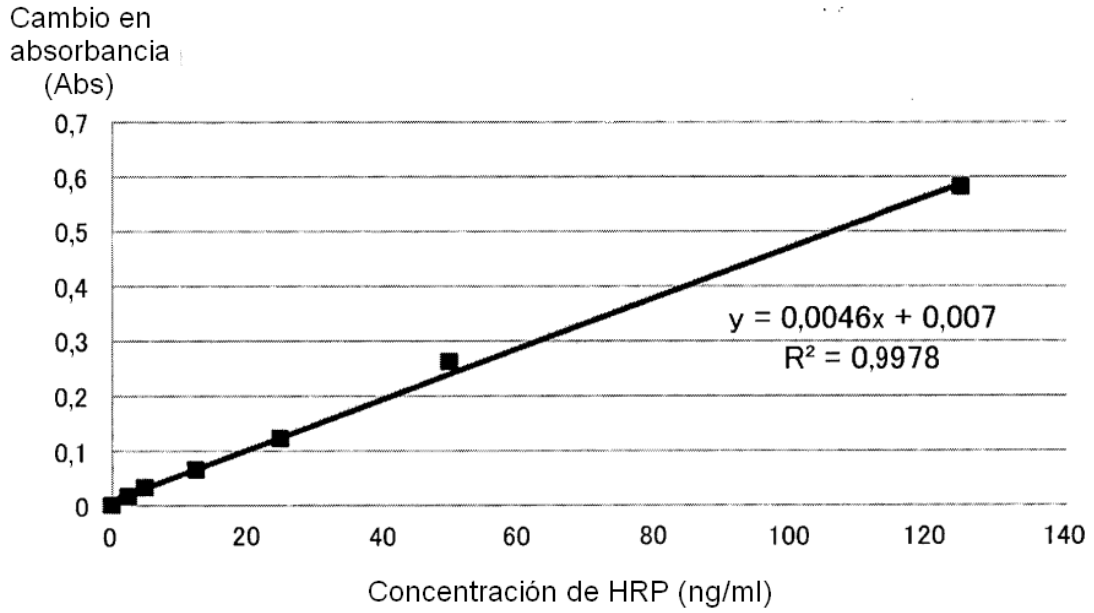


Fig. 23

