



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 113 294**

⑫ Número de solicitud: 9501554

⑤① Int. Cl.⁶: C12Q 1/28

G01N 21/76

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **01.08.95**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.98**

⑫③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.04.98

⑦① Solicitante/s:
**Universidad de Málaga, en su nombre
el Rector Antonio Díez de los Ríos
Plaza de El Ejido s/n
29071 Málaga, ES**

⑦② Inventor/es: **Navas Díaz, Aurora;
García Sánchez, Francisco y
González García, José Antonio**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Método para aumentar la sensibilidad de un ensayo quimioluminiscente utilizando compuestos aromáticos con grupos amino e hidroxilo como intensificadores.**

⑤⑦ Resumen:

Método para aumentar la sensibilidad de un ensayo quimioluminiscente, utilizando compuestos aromáticos con grupos amino e hidroxilo como intensificadores.

La presente invención se refiere a un método, que tiene por finalidad aumentar significativamente la reacción quimioluminiscente del sistema luminol - H₂O₂ - peroxidasa, consistente en la utilización de compuestos que intensifican la emisión de luz que produce luminol u otra hidrazida cíclica en presencia de un peróxido y una peroxidasa, o conjugado de la misma, con lo que se consigue aumentar la sensibilidad en la detección de los componentes de la reacción quimioluminiscente. Los compuestos aromáticos con grupos amino e hidroxilo utilizados como intensificadores de la reacción quimioluminiscente son: 4 - Hidroxibenzoato de etilo, 4 - Hidroxibenzoato de propilo, 4 - Hidroxiacetofenona, 7 - Hidroxicumarina, 7 - Hidroxilo - 4 - metilcumarina, 4 - Hidroxibenzonitrilo, Acetato de fenilo, Acetato de 2 - naftilo, 2 - Aminonaftaleno, 5 - Aminoisoquinolina, 2 - Hidroxilo - 9 - fluorenona.

ES 2 113 294 A1

DESCRIPCION

Método para aumentar la sensibilidad de un ensayo quimioluminiscente utilizando compuestos aromáticos con grupos amino e hidroxilo como intensificadores.

La presente invención se refiere a un método para aumentar la sensibilidad de la quimioluminiscencia utilizando compuestos aromáticos con grupos hidroxilo y amino como intensificadores, siendo estos compuestos relativamente habituales en los laboratorios y en la industria, asequibles en estado puro y sustancialmente más económicos que los intensificadores más utilizados actualmente, por lo que podrían ser una alternativa a estos últimos.

Campo de la técnica

Esta invención tiene su aplicación dentro de la industria dedicada a la fabricación de productos químicos, especialmente de productos químicos aplicables en la quimioluminiscencia. Es de interés en el campo del análisis químico, en concreto del análisis quimioluminiscente, englobando luminol como reactivo. Sus aplicaciones van desde determinaciones bioquímicas como el inmunoensayo, determinaciones enzimáticas, etc., hasta determinaciones de peróxido de hidrógeno u otros peróxidos, del mismo luminol, de los citados intensificadores y, en general, de cualquier analito cuya reacción pueda acoplarse con la reacción quimioluminiscente intensificada.

Antecedentes de la invención

Desde que en 1983 se descubriese el efecto aumentador de la luciferina de luciérnaga sobre la quimioluminiscencia del sistema luminol - H_2O_2 - peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidasa) o conjugados de esta enzima (Whitehead y otros, Nature, 305 (1983) 158 - 159), numerosos trabajos se han sucedido aplicando éste y otros compuestos aumentadores de la quimioluminiscencia a inmunoensayos, determinaciones enzimáticas, etc.

También han sido numerosas las patentes de invención de tales compuestos realizadas desde la citada fecha hasta nuestros días, entre las cuales se conocen las patentes europeas números 116.454 (1983) y 219.352 (1987), así como las de Estados Unidos números 4.598.044 (1986) y 4.729.950 (1988).

La luz obtenida con la quimioluminiscencia intensificada es muy intensa y prolongada, de manera que es fácilmente detectable y medible.

Numerosos aumentadores se conocen hasta la fecha, entre los cuales se pueden citar los siguientes:

- Benzotiazoles: 6 - hidroxibenzotiazol, 2 - ciano - 6 - hidroxibenzotiazol, dehidroluciferina, luciferina de luciérnaga.

- Fenoles; p - fenilfenol, ácido p - hidroxicinámico, p - iodofenol, p - bromofenol, p - clorofenol, 2 - cloro - 4 - bromofenol, 2,4 - diclorofenol, 3,4 - diclorofenol, p - metilfenol.

- Naftoles; 2 - naftol, 1 - bromo - 2 - naftol, 6 - bromo - 2 - naftol, 1,6 - dibromo - 2 - naftol.

- Aminas aromáticas: N, N, N', N' - tetrametilbenzidina, 4 - benziloxianilina, 4 - metoxianilina, toluidina, 4 - metoxianilina.

- Derivados de ácidos borónicos de arilo;

ácidos 4 - bifenilborónico, 4 - iodofenilborónico, 4 - bromofenilborónico.

No obstante, estos aumentadores tienen el inconveniente de que o bien son difíciles de adquirir en el mercado, o bien su adquisición supone costes considerables, o bien su efecto aumentador presenta una intensidad limitada.

Descripción de la invención

El método para aumentar la sensibilidad de un ensayo quimioluminiscente utilizando compuesto con grupos amino e hidroxilo como intensificadores, objeto de la invención, está basado en la capacidad de ciertos compuestos aromáticos con grupos amino e hidroxilo, de fácil adquisición en el mercado, de aumentar significativamente la sensibilidad de la reacción quimioluminiscente del sistema luminol - peróxido de hidrógeno - peroxidasa de rábano picante, siendo estos compuestos una alternativa a otros intensificadores ya conocidos. Algunos de los compuestos descritos en esta invención, tales como 4 - hidroxibenzoato de etilo y propilo, son conocidos aditivos conservadores de alimentos (E - 124 y E - 216). En cuanto a las cumarinas, producen cierta emisión quimioluminiscente en ausencia de luminol, sin embargo en presencia de éste la emisión observada es mucho mayor.

La forma en que el luminol toma parte en el ensayo quimioluminiscente, de acuerdo con la presente invención, depende del tipo de ensayo. En este caso más frecuente e importante de un inmunoensayo organoluminiscente, el luminol se utiliza como un marcador unido por el grupo amino a una proteína, hapteno, hormona, esteroide, antígeno o anticuerpo, bien directamente, o bien mediante un brazo espaciador.

La peroxidasa puede actuar, en el caso de un inmunoensayo, también como un marcador de una proteína, hapteno, anticuerpo, hormona, etc. En el caso de ensayos en los que la peroxidasa no actúa como marcador, el enzima puede estar en forma libre, en solución o inmovilizada en una matriz y constituye la base de un tipo de biosensores.

La emisión de luz en el ensayo de esta invención, depende de la elección del tipo de peroxidasa, del oxidante y de la sensibilidad del aumentador, siendo también dependiente de las condiciones experimentales determinadas por factores tales como pueden ser el pH, la concentración de los reactivos, la velocidad de mezcla, la temperatura y el sistema de medida de la luz.

Las condiciones optimizadas en la presente invención, son un compromiso entre la actividad catalítica del enzima peroxidasa, la cinética de la reacción, el aparato empleado, la reacción señal - ruido, la concentración relativa de los reactivos y la sensibilidad requerida.

En concreto, los compuestos aromáticos con grupos amino e hidroxilo, con marcado efecto aumentador de la quimioluminiscencia del sistema luminol - H_2O_2 - horseradish peroxidasa, objeto de la presente invención, son los siguientes:

- 4 - Hidroxibenzoato de etilo.
- 4 - Hidroxibenzoato de propilo.
- 4 - Hidroxiacetofenona.
- 7 - Hidroxicumarina.
- 7 - Hidroxil - 4 - metilcumarina.

- 4 - Hidroxibenzonitrilo.
- Acetato de fenilo.
- Acetato de 2 - naftilo.
- 2 - Aminonaftaleno.
- 5 - Aminoisoquinolina.
- 2 - Hidroxi - 9 - fluorenona.

Realización preferente de la invención

El método para aumentar la sensibilidad de un ensayo quimioluminiscente, utilizando compuestos aromáticos con grupos hidroxilo y amino como intensificadores, que se preconiza en la presente invención, se detalla a continuación.

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Perkin - Elmer, modelo LS - 50, con la fuente de luz apagada y el aparato puesto en modo fosforescencia, con un tiempo de decaimiento (delay time) de 0.00 milisegundos, un tiempo de puerta (gate time) de 30.000 milisegundos, y la rendija de emisión puesta a 20 nm, con λ_{em} de 425 nm y el voltaje del fotomultiplicador de 700 V.

Se emplearon disoluciones de buffer - Tris - HCl (1 mL, 0.1 M, pH 8,5), luminol (20 μ L, 0.01 M) peróxido de hidrógeno (60 μ L, 0.1 M) y un volumen determinado de disolución del compuesto aumentador, que se introducen en la cubeta de cuarzo, siendo llevada la disolución en cubeta a 2945 μ L con agua destilada y desionizada.

La cubeta se coloca en el espectrofotómetro dentro de un dispositivo especial consistente en una caja, cerrada a la luz, con un receptáculo para la cubeta, de tal forma que la parte abierta de éste coincide con un septum por donde se inyecta, con

una jeringa, el último reactivo (55 μ L de horseridash peroxidasa 71.3 (U/mL).

Durante la reacción quimioluminiscente la disolución se agita mediante un pequeño agitador magnético.

La emisión quimioluminiscente se recoge durante los primeros cinco minutos mediante la opción "time drive" del espectrofotómetro Perkin - Elmer.

También se miden las áreas de las curvas de intensidad de luz emitida frente al tiempo, considerando esta medida más indicativa de la capacidad aumentadora de la quimioluminiscencia por cada intensificador que la intensidad máxima.

Las áreas de tales curvas presentan un máximo que dependió de la concentración del aumentador empleado y del tipo de aumentador.

Las señales máximas relativas obtenidas en estas condiciones para cada compuesto aumentador (en comparación con la emisión del blanco sin aumentador) fueron las siguientes:

- 4 - Hidroxibenzoato de etilo (14.8 veces la emisión sin aumentador)
- 4 - Hidroxibenzoato de propilo (15.2 veces)
- 4 - Hidroxiacetofenona (17.7 veces)
- 7 - Hidroxicumarina (23.3 veces)
- 7 - Hidroxi - 4 - metilcumarina (19 veces)
- 4 - Hidroxibenzonitrilo (5,1 veces)
- Acetato de fenilo (5 veces)
- Acetato de 2 - naftilo (4 veces)
- 2 - Aminonaftaleno (2.2 veces)
- 5 - Aminoisoquinolina (5.6 veces)
- 2 - Hidroxi - 9 - fluorenona (8.7 veces)

REIVINDICACIONES

1. Método para aumentar la sensibilidad de un ensayo quimioluminiscente, utilizando compuestos aromáticos con grupos amino e hidroxilo como intensificadores de la reacción quimioluminiscente de peróxido de hidrógeno u otro tipo de peróxido, luminol o conjugados de luminol y peroxidasa de rábano picante o conjugados de esta enzima, consistente en la utilización de compuestos que intensifican la emisión de luz que produzca luminol u otra hidrazida cíclica en presencia de un peróxido y una peroxidasa, o conjugado de la misma, con lo que se consigue aumentar la sensibilidad en la detección de los componentes de la reacción quimioluminiscente, **caracterizado** porque se utiliza como intensificador de la reacción uno de los siguientes compuestos aromáticos con grupos amino e hidroxilo: 4 - Hidroxibenzoato de etilo, 4 - Hidroxibenzoato de propilo, 4 - Hidroxiacetofenona, 7 - Hidroxicumarina, 7 - Hidroxil - 4 - metilcumarina, 4 - Hidroxibenzonitrilo, Acetato de fenilo, Acetato de 2 - naftilo,

2 - Aminonaftaleno, 5 - Aminoisoquinolina, 2 - Hidroxil - 9 - fluorenona.

2. Método según reivindicación 1, **caracterizado** porque se utiliza una disolución de buffer - Tris - HCl (1 mL, 0.1 M, pH 8,5), luminol (20 μ L, 0.01 M), peróxido de hidrógeno (60 μ L, 0.1 M) y un volumen determinado de uno de los compuestos aumentadores indicados en la reivindicación 1, llevando la disolución a 2945 μ L con agua destilada y desionizada en una cubeta, en la que, una vez colocada en el fluorímetro, se inyecta el reactivo peroxidasa de rábano picante (55 μ L, 71.3 U/mL), agitándose la disolución mediante un agitador magnético, antes de realizar las medidas de intensidad de la quimioluminiscencia.

3. Uso de los compuestos aromáticos con grupos amino e hidroxilo, que se especifican en la reivindicación 1, como intensificadores de la reacción quimioluminiscente de peróxido de hidrógeno u otro tipo de peróxido, luminol o conjugados de luminol y peroxidasa de rábano picante o conjugados de esta enzima.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 113 294
⑫ N.º solicitud: 9501554
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 01.08.95
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12Q 1/28, G01N 21/76

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US-5206149-A (OYAMA, Y. y col.) 27.04.93 * Columna 2, línea 12-21; columna 3, ejemplo 1 *	1,2
A	GB-1226874-A (PHILIPS' GLOEILAMPENFAB.) 31.03.71 * Columna 2, líneas 63-70 *	1-3
A	EP-219352-A (MINNESOTA MINING AND MANUFACTURING COMPANY) 22.04.87 * Todo el documento *	1-3
A	EP-116454-A (SECRETARY OF STATE FOR SOCIAL SERVICES OF THE U.K.) 22.08.84 * Todo el documento *	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
02.03.98

Examinador
E. Albarrán Gómez

Página
1/1