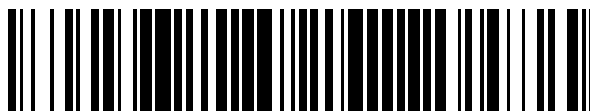


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 007**

51 Int. Cl.:  
**C07D 279/22** (2006.01)  
**C12Q 1/28** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**C07D 279/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08150411 .0**  
96 Fecha de presentación: **18.01.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1950207**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Preparación de N-alkilsulfonatos de fenotiazina de alta pureza y su uso en ensayos de quimioluminiscencia para la medición de la actividad peroxidasa**

30 Prioridad:  
**24.01.2007 IT BO20070037**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.10.2012**

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

72 Inventor/es:  
**Della Ciana, Leopoldo**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 388 007 T3

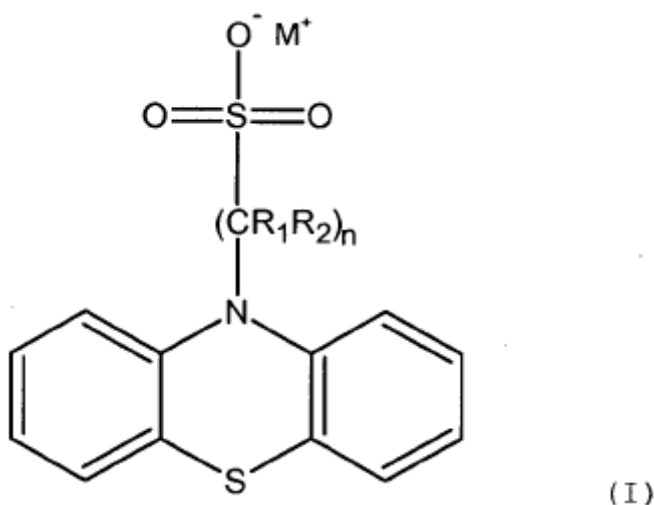
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Preparación de N-alkilsulfonatos de fenotiazina de alta pureza y su uso en ensayos de quimioluminiscencia para la medición de la actividad peroxidasa

Los derivados de fenotiazina, solubles en agua y, especialmente, los N-alkilsulfonatos descritos en la presente invención, son compuestos útiles para diversas aplicaciones comerciales, incluyendo su uso como reactivos para ensayos químicos y biológicos y, en particular, como potenciadores de la actividad de la enzima peroxidasa en ensayos de quimioluminiscencia con luminol, y como aceleradores en sistemas peroxidasa/acelerador en la composición de detergentes y en sistemas para la conversión de la energía solar en energía química o eléctrica.

La clase de compuestos relacionados con la presente invención puede ser representada por la fórmula (I):



en la que  $M^+$  es un catión y  $n$  es un número entero. El catión puede ser  $H^+$ , un catión monovalente (tal como  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ), otro catión inorgánico, un catión orgánico, etc., o un catión polivalente (incluyendo cationes divalentes) donde la carga restante es neutralizada por otros aniones (por ejemplo, haluros, nitratos, sulfatos, fosfatos) o puede formar múltiples sales con otras moléculas de N-alkilsulfonatos de fenotiazina.

La cadena alquilo  $-(CR_1R_2)_n-$ , que conecta el grupo sulfónico al nitrógeno de fenotiazina, puede contener cualquier número  $\geq 2$  de grupos metileno, aunque  $n = 3$  (propilo) y  $n = 4$  (butilo) son especialmente preferentes. Los grupos metileno  $CR_1R_2$  en la cadena alquilo pueden ser disustituídos, monosustituídos o no sustituidos.

Esta clase de compuestos es relativamente costosa, especialmente debido a que los procedimientos sintéticos actuales son ineficientes. Además, y de manera más significativa, los productos preparados según los procedimientos actuales son muy difíciles de obtener en la forma extremadamente pura requerida por los ensayos inmunoenzimáticos basados en la determinación de la actividad peroxidasa por medio de quimioluminiscencia.

Un procedimiento sintético para la síntesis de 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio es descrito por Y. Kawanishi, N. Kitamura y S. Tazuke, J. en "Coulombic Effect of Photoinduced Electron-Transfer Reactions between Phenothiazines and Viologens", J. Phys. Chem. 1986; 90:2469-2475. Este procedimiento requiere dos etapas:

(1) La sal de sodio de fenotiazina se hace reaccionar con un exceso de 1,3-dibromopropano. El producto, 10-(3-bromopropil) fenotiazina se obtiene con un rendimiento del 18% después de una purificación mediante cromatografía en columna ( $Al_2O_3$ /hexano).

(2) La 10-(3-bromopropil)fenotiazina purificada se hace reaccionar con un ligero exceso de sulfito de sodio en acetonitrilo-agua (4/1 v/v). El solvente es eliminado y el producto crudo es disuelto en una pequeña cantidad de metanol y se vuelve a precipitar con benceno seco. El precipitado es recogido sobre un filtro, es secado y purificado mediante cromatografía en gel. El producto purificado, 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio, se obtiene con un rendimiento del 51%.

Según este procedimiento, el producto deseado, 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio, se obtiene con un rendimiento total de sólo el 9%, y con el uso masivo de procedimientos cromatográficos costosos. Un procedimiento similar es descrito también por M. Sakaguchi, M. Hu y L. K. en "Photoionization of Alkylphenothiazines in Vesicles: Effects of the Alkyl Chain Length and the Vesicle Surface Charge", J. Phys. Chem., 1990; 94:870-874; el rendimiento no

se muestra).

En la patente US No. 5.171.668 "Method of the Chemiluminescence Assays of the Activity of Peroxidase", concedida a Fujirebio, se describe, por primera vez, el uso de derivados de N-alquilsulfonato de fenotiazinas y, en particular, de 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio, como potenciadores de la quimioluminiscencia de luminol. Esta patente no contiene ninguna descripción específica del procedimiento de preparación de los derivados de N-alquilsulfonato de fenotiazinas empleados como potenciadores, sino que hace referencia, simplemente, a los procedimientos sintéticos generales de fenotiazinas indicados en Bodea et al, *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 1968; 9:322-460. Los resultados obtenidos por Fujirebio con derivados de N-alquilsulfonato de fenotiazina y, en particular, con 3-(fenotiazina-10-il)propano-1-sulfonato de sodio, no son significativamente mejores que los observados con un potenciador estándar, tal como 4-yodofenol, a excepción de una "mayor reproducibilidad", definida vagamente.

Por el contrario, la patente US No. 6.432.662, "Assay of Peroxidase Activity", concedida a Pierce, describe un procedimiento para el ensayo de la actividad peroxidasa, el cual, aunque usa los mismos potenciadores que los descritos en la Patente US No. 5.171.668 de Fujirebio y, en particular, 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio, se afirma que ofrece un rendimiento muy superior en términos de cinética e intensidad de la señal quimioluminiscente. Según la patente US No. 6.432.662, dicha diferencia de rendimiento se atribuye a la presencia de impurezas en el potenciador. En particular, la presencia de fenotiazina en el potenciador desactiva la enzima peroxidasa y, por tanto, es extremadamente perjudicial para la producción de la señal quimioluminiscente.

El procedimiento descrito en la patente US No. 6.432.662 para la preparación del potenciador, 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio, es el procedimiento de Y. Kawanishi, N. Kitamura y S. Tazuke, indicado anteriormente. Además, según la patente US No. 6.432.662, el producto obtenido con este procedimiento contiene "impurezas o trazas de impurezas que no pueden ser eliminadas mediante procedimientos convencionales conocidos en la técnica", sin revelar ningún procedimiento de purificación específico.

Por otra parte, hay que subrayar que la necesidad de usar materiales de alta pureza en sustratos para quimioluminiscencia es ampliamente conocida.

Por ejemplo, el artículo de M.A. Motsenbocker y K. Kondo, "Improvements to Enhanced Horseradish Peroxidase Detection Sensitivity" *J. Biolum. Chemilumin.*, 1994; 9:15-20 (1994) afirma que: "Los resultados son consistentes con un mecanismo de interferencia sencillo mediante el cual los radicales del potenciador producidos por la enzima son neutralizados preferentemente por los contaminantes en el luminol, en el potenciador y en el solvente usado para solubilizar el potenciador. El consumo de estos interferentes retrasa la emisión de luz y reduce el límite de detección de la peroxidasa (HRP)".

Es evidente que el procedimiento de síntesis de 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio, descrito inicialmente por Y. Kawanishi, N. Kitamura y S. Tazuke, y usado subsiguientemente en la patente US No. 6.432.662, no sólo es ineficiente (rendimiento del 9%), sino que genera un producto contaminado con impurezas que son muy difíciles de eliminar. La presencia de estas impurezas es incompatible con el uso de 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio como potenciador de la quimioluminiscencia en ensayos para la determinación de la peroxidasa.

ELECTROANALYSIS, 18(18), 1771-1777, 2006 divulga un procedimiento de preparación de PPSA ácido (3-(10H-fenoxazin-10-il)-1-propanosulfónico) vía un procedimiento de dos etapas que comprende la reacción de fenoxazina con NaH en dioxano, seguido por una reacción con 1,3-propanosulfona y la precipitación del producto.

JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY, 94(2), 870-4, 1990 divulga un procedimiento de preparación (PC3SO3Na) vía un procedimiento de dos etapas que comprende la reacción de fenotiazina con NaH y un 1,3-dibromopropano, seguido por una reacción con Na2SO3.

### Breve descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es un nuevo procedimiento para la síntesis de derivados de N-alquilsulfonato de fenotiazina de excepcional pureza y en altos rendimientos. El procedimiento consiste en la reacción del anión de fenotiazina con una alquil sulfona (sulfona cíclica) en un solvente apropiado.

El procedimiento es simple y directo, basado en la cristalización del producto puro a partir de la mezcla de reacción. Por el contrario, las impurezas permanecen en solución y, a continuación, son eliminadas de una manera muy sencilla y efectiva.

La extraordinaria pureza de los derivados de N-alquilsulfonato de fenotiazina obtenidos mediante el procedimiento de la presente invención es de vital importancia para su uso como potenciadores de quimioluminiscencia en los ensayos de la peroxidasa. Este es un objeto adicional de la presente invención.

**Breve descripción de los dibujos**

- **Figura 1:** gráfico de la señal de quimioluminiscencia como una función de la concentración de [3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio].
- 5      – **Figura 2:** gráfico de la señal de quimioluminiscencia como una función de la concentración de solución de sustrato.
- **Figura 3:** gráfico de la señal de quimioluminiscencia como una función del pH.
- **Figura 4:** gráfico de la señal de quimioluminiscencia como una función de la composición de la solución de sustrato.

**Descripción detallada de la invención**

10      En contraste con el procedimiento de la literatura, que requiere dos etapas, el procedimiento de la presente invención requiere sólo una etapa.

En particular, el anión de fenotiazina es generado *in situ* mediante la adición de una base, tal como hidruro sódico, amida de sodio, butil-litio, diisopropilamida de litio y similares, en tetrahidrofurano, 1,3-propano sulfona o 1,4-butano sulfona se añade a continuación, neta o disuelta en un solvente.

15      Al final de la reacción, frecuentemente, el producto se separa de la solución en forma cristalina y con un alto grado de pureza. Si se desea un grado de pureza todavía mayor, es suficiente con recrystalizar el producto a partir de etanol, agua o sus mezclas.

20      Los productos obtenidos mediante el procedimiento de la presente invención y, en particular, 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio y 4-(fenotiazin-10-il)butano-1-sulfonato de sodio son de muy alta pureza. En particular, están totalmente libres de trazas de fenotiazina, lo que causa la inactivación de las enzimas de peroxidasa, tales como la peroxidasa de rábano.

25      La extraordinaria pureza de 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio y 4-(fenotiazin-10-il)butano-1-sulfonato de sodio obtenidos mediante el procedimiento de la presente invención permite que sean usados como potenciadores de la quimioluminiscencia, incluso en cantidades considerablemente grandes. Por ejemplo, un sustrato típico para la detección de la quimioluminiscencia de la peroxidasa contiene (a) la sal sódica de luminol preferentemente a una concentración entre 2 y 12 mM, más preferentemente, a una concentración entre 5 y 10 mM; además, contiene (b) un potenciador de 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio y 4-(fenotiazin-10-il) butano-1-sulfonato de sodio, preparados según la presente invención, a una concentración entre 2 y 8 mM, más preferentemente a una concentración de entre 3 y 6 mM, y también (c) una fuente de peróxido, preferentemente a una concentración entre 2 y 10 mM y, más preferentemente, a una concentración de entre 4 y 8 mM.

30      La solución de sustrato, conocida también como solución de trabajo, es tamponada, preferentemente, entre pH 7,8 y 9,0, más preferentemente, entre pH 8,2 y pH 8,8. El tampón puede ser Tris, tricina, ecc.

35      La solución de sustrato puede ser preparada justo antes de su uso, o si no, puede ser obtenida mezclando dos soluciones, una que contiene luminol y el potenciador y la otra, la fuente de peróxido. Una vez preparada, la estabilidad de la solución está limitada a aproximadamente 24 horas, si se mantiene a 4-8°C. Una formulación especialmente preferente consiste en:

- Solución A: 10,0 mM sodio luminol; 6,0 mM 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio en 0,3 M tampón Tris, pH 9,6
- Solución B: 8,0 mM perborato de sodio en 50 mM tampón de acetato, pH 5,0

40      Ambas soluciones son estables durante al menos 12 meses a 4-8°C. C. La solución de trabajo es preparada justo antes de su uso mezclando volúmenes iguales de las Soluciones A y B. El pH de la mezcla debe estar entre pH 8,4 y pH 8,7. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que debido a que la reacción de quimioluminiscencia está influenciada por la concentración de luminol, del potenciador y el pH, es necesario optimizar la composición del sustrato dependiendo de la aplicación.

45      El sustrato quimioluminiscente, obtenido de esta manera, puede ser usado en un gran número de ensayos de quimioluminiscencia de peroxidasa de rábano, tanto en solución como en aplicaciones de transferencia, incluyendo inmunotransferencia o transferencia Western, transferencia en mancha o transferencia Dot, transferencia de ADN o transferencia Southern, transferencia de ARN o transferencia Northern o cualquier otro sistema de membrana que usa peroxidasa de rábano, u otras peroxidases, tal como una enzima marcadora para la cuantificación de antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos.

50

## Ejemplos

Los ejemplos siguientes sirven para ilustrar aspectos específicos de la invención. Sin embargo, no se pretende que estos ejemplos limiten la invención.

### Ejemplo 1

#### 5 Síntesis de 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio

Una porción de hidruro de sodio (17,7 g, 0,44 moles), dispersada en aceite mineral, es lavada primero con éter de petróleo (p.e. 40-60°C) y, a continuación, es suspendida en 200 ml de tetrahidrofurano seco, en un matraz de tres cuellos, de 2 L. Una solución de fenotiazina (80,0 g, 0,4 moles) disuelta en tetrahidrofurano (400 ml) es añadida bajo argón, a través de una cánula. La mezcla es agitada, siempre bajo argón, durante una hora a temperatura ambiente y, a continuación, durante 30 minutos a 50°C. La mezcla adquiere un color naranja, después de la formación del anión de fenotiazina. Después de que la suspensión se ha enfriado a 0°C, una solución de 1,3-propanosultona (35 ml, 0,4 moles) en tetrahidrofurano es añadida también a través de una cánula. El color de la mezcla cambia, casi inmediatamente, a amarillo claro. La mezcla es agitada a 0°C durante treinta minutos después de la adición de la sultona y, a continuación, a temperatura ambiente durante otros treinta minutos.

15 Durante este período, la mezcla se vuelve casi incolora y homogénea, con la disolución total del material en suspensión. Subsiguientemente, el producto precipita en forma cristalina. Al final de la reacción, el producto es separado de la solución mediante filtración y es lavado a fondo, primero con tetrahidrofurano y, a continuación, con éter. Rendimiento: 127,6 g (92,9%). El producto ya es de alta pureza. En particular, un análisis cromatográfico (HPLC,  $\lambda = 254$  nm) muestra que el contenido de fenotiazina en el producto es inferior a 0,0002 partes (mol/mol). Otras impurezas pueden ser eliminadas eficientemente mediante recristalización a partir de etanol. Masa molecular ( $C_{15}H_{14}NaO_3S_2$ ): 343,40.  $^1H$  RMN 300 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ : 6,9-7,1 (m, 4H, ArH), 6,7-6,9 (m, 4H, ArH), 3,8 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-N, J = 9,9 Hz), 2,5 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-S, J = 11,2 Hz), 1,8-2,0 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). Masa molecular del ácido libre ( $C_{15}H_{15}O_3S_2$ ): 321,42. MS (API-ES): 322,0 [MH]<sup>+</sup>.

### Ejemplo 2

#### 25 Síntesis de 4-(fenotiazin-10-il)butano-1-sulfonato de sodio

La síntesis de 4-(fenotiazin-10-il)butano-1-sulfonato de sodio es similar a la descrita en el Ejemplo anterior. La única diferencia reside en que se usa una solución de 1,4-butano sultona (41 ml, 0,40 moles) en tetrahidrofurano (200 ml) en lugar de la solución de 1,3-propanosultona. De nuevo, el producto, 4-(fenotiazin-10-il)butano-1-sulfonato de sodio, cristaliza a partir de la mezcla de reacción. Rendimiento: 122,4 g (85,6%). El producto ya es de alta pureza. En particular, un análisis cromatográfico (HPLC,  $\lambda = 254$  nm) muestra que el contenido de fenotiazina en el producto es inferior a 0,0002 partes (mol/mol).

Masa molecular ( $C_{16}H_{16}NaO_3S_2$ ): 357,42.  $^1H$  RMN (300 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$ : 6,9-7,1 (m, 4H, ArH), 6,7-6,9 (m, 4H, ArH), 3,7 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-N, J = 9,9 Hz), 2,5 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>Na, J = 11,2 Hz), 1,5-1,8 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>). Masa molecular del ácido libre ( $C_{16}H_{17}O_3S_2$ ): 335,44. MS (API-ES): 336,3 [MH]<sup>+</sup>.

### 35 Ejemplo 3

#### Dependencia de la reacción luminol-peróxido-peroxidasa sobre la concentración de 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio

Todas las mediciones indicadas en el Ejemplo 3 fueron llevadas a cabo con un espectrofluorímetro (Varian Eclipse), modo Bio/Quimioluminiscencia (longitud de onda de emisión: 425 nm; rendija de emisión: 20 nm). Se preparan una serie de sustratos en 0,1 M Tampón Tris, pH 8,6, con las composiciones siguientes:

- [sal de sodio luminol] = 2,50 mM
- [perborato sódico] = 2,00 mM
- 3-(fenotiazin-10-il) propano-1-sulfonato = 11,5  $\mu$ M, 23  $\mu$ M, 47  $\mu$ M, 94  $\mu$ M, 188  $\mu$ M, 375  $\mu$ M, 1.500  $\mu$ M y 3000  $\mu$ M.

45 A una cubeta de fluorimetría de polimetilmetacrilato que contiene 2 ml de cada sustrato, se añaden 10  $\mu$ l de una solución de 0,5  $\mu$ g/ml de peroxidasa de rábano (HRP-Tipo VIIA). Después de mezclar la solución con un vórtice durante unos pocos segundos, se inicia la medición de la señal luminiscente. En todos los casos, la señal quimioluminiscente alcanza una meseta en unos pocos minutos y, a continuación, permanece estable durante al menos treinta minutos. La dependencia de la señal quimioluminiscente (valor meseta) para cada sustrato, se indica gráficamente en la Figura 1.

50 La señal luminiscente crece muy rápidamente con una concentración creciente del potenciador, 3-(fenotiazin-10-

il)propano-1-sulfonato, hasta que alcanza un valor máximo entre 0,5 y 1 mM. Al elevar adicionalmente la concentración del potenciador, la señal quimioluminiscente comienza a declinar lentamente. A la máxima concentración del potenciador, 3,0 mM, la señal es de aproximadamente el 70% del valor máximo.

#### Ejemplo 4

##### 5 Dependencia de la reacción luminol-peróxido-peroxidasa mejorada con 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio sobre la concentración de luminol

Todas las mediciones indicadas en el Ejemplo 4 fueron llevadas a cabo con un espectrofluorímetro (Varian Eclipse), modo Bio/Quimioluminiscencia (longitud de onda de emisión: 425 nm; rendija de emisión: 20 nm). Se preparan una serie de sustratos en 0,1 M Tampón Tris, pH 8,6, con las composiciones siguientes:

- 10
- [sal de sodio luminol] = 0,625 mM, 1,25 mM, 2,50 mM, 5,0 mM, 10 mM.
  - [perborato sódico] = 2,00 mM
  - 3-(fenotiazin-10-il) propano-1-sulfonato = 0,75 mM

15 A una cubeta de fluorimetría de polimetilmetacrilato, que contiene 2 ml de cada sustrato, se añaden 10 µl de una solución de 0,5 µg/ml de peroxidasa de rábano (HRP-Tipo VIIA). Después de mezclar la solución con un vórtice durante unos pocos segundos, se inicia la medición de la señal luminiscente. En todos los casos, la señal quimioluminiscente alcanza una meseta en unos pocos minutos y, a continuación, permanece estable durante al menos treinta minutos. La dependencia de la señal quimioluminiscente (valor meseta) para cada sustrato, se indica gráficamente en la Figura 2. La señal luminiscente crece gradualmente muy rápidamente con una concentración creciente del luminol, hasta que alcanza un valor máximo entre 0,5 y 1 mM. Al elevar adicionalmente la concentración del potenciador, la señal quimioluminiscente comienza a declinar lentamente. A la máxima concentración del potenciador, 3,0 mM, la señal es de aproximadamente el 70% del valor máximo. La señal luminiscente crece gradualmente, y alcanza una meseta a la máxima concentración de luminol usada en el experimento, 10 mM.

20

#### Ejemplo 5

##### 25 Dependencia del pH de la reacción de luminol-peróxido-peroxidasa mejorada por 3-(fenotiazin-10-il) propano-1-sulfonato de sodio

Todas las mediciones indicadas en el Ejemplo 5 fueron llevadas a cabo con un fluorímetro (Varian Eclipse), modo Bio/Quimioluminiscencia (longitud de onda de la emisión: 425 nm; rendija de emisión: 10 nm; filtro de emisión: abierto; tensión fotomultiplicador: media). Se prepara una serie de sustratos en 0,125 M Tampón Tris, pH 9,1, con la siguiente composición:

- 30
- [sal de sodio luminol] = 5,0 mM.
  - [perborato de sodio] = 4,00 mM
  - 3-(fenotiazin-10-il) propano-1-sulfonato = 1,50 mM

35 Se prepara una serie de cubetas de fluorimetría de polimetilmetacrilato, que contiene, cada una, 2 ml de sustrato. A cada cubeta se añade una pequeña cantidad de 5M o 12M HCl, con el fin de ajustar el pH a los valores siguientes: 9,02, 8,76, 8,51, 8,41, 8,28, 8,14 y 7,95, y limitando los cambios en el volumen total a menos del 5%. A continuación, se añaden, a cada cubeta, 10 µl de una solución de 0,5 µg/ml de peroxidasa de rábano (HRP-Tipo VIIA). Después de mezclar la solución con un vórtice durante unos pocos segundos, se inicia la medición de la señal luminiscente. En todos los casos, la señal quimioluminiscente alcanza un valor constante dentro de unos pocos segundos. A partir de los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 3, es evidente que la señal quimioluminiscente alcanza el valor máximo en el intervalo entre pH 8,3 y pH 8,6.

40

#### Ejemplo 6

##### Comparación entre 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio, p-yodofenol, ácido p-cumárico y ácido 4-yodofenilborónico

45 Todas las mediciones indicadas en el Ejemplo 6 fueron llevadas a cabo con un espectrofluorímetro (Varian Eclipse), modo Bio/Quimioluminiscencia (longitud de onda de emisión: 425 nm; rendija de emisión: 20 nm). Se preparan una serie de cubetas de fluorimetría de polimetilmetacrilato, conteniendo cada una 2 ml de la solución de sustrato siguiente en 0,1 M Tampón Tris, pH 8,6. 1,25 mM de sal de sodio luminol, 2,50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

- Solución A: 0,68 mM de ácido p-cumárico

- Solución B: 0,77 mM de ácido 4-yodofenilborónico
- Solución C: 0,62 mM de p-yodofenol
- Solución D: 0,75 mM de 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio

Se preparó otro sustrato, Solución E, con la composición siguiente:

- 5
- 5 mM de sal de sodio luminol
  - 3 mM de 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio
  - 4 mM de perborato de sodio

10 Subsiguientemente, se añaden, a cada cubeta, 10 µl de una solución de 0,5 µg/ml de peroxidasa de rábano (HRP-Tipo VIIA). Después de mezclar la solución con un vórtice durante unos pocos segundos, la señal luminiscente es medida durante 30 min. Los resultados obtenidos se muestran en un gráfico en la Figura 4.

### Ejemplo 7

#### Sustrato para medir la peroxidasa mediante quimioluminiscencia

Una solución de trabajo (sustrato de quimioluminiscencia) para medir la peroxidasa puede ser obtenida mezclando partes iguales de las soluciones siguientes:

- 15
- Solución luminol/potenciador: 10 mM de luminol, sal de sodio y 6 mM 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio (potenciador), preparado tal como se describe en el Ejemplo 1 en 0,3 M Tampón Tris, pH 9,6.
  - Solución de peróxido: 8 mM perborato de sodio en 50 mM, pH 5,0 tampón de acetato

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

- 20
- 5,0 mM luminol, sal de sodio 5,0 mM
  - 3,0 mM 3-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio
  - 4 mM perborato sódico
  - 0,25 mM acetato de sodio

en 0,15 mM Tampón Tris Tris, pH 8,6.

### Ejemplo 8

#### Aplicación de la reacción quimioluminiscente mejorada mediante 3-(fenotiazin-10-il) propano-1-sulfonato de sodio a un ensayo de membrana de peroxidasa.

30 Sobre una lámina de membrana de nitrocelulosa, usada comúnmente para los ensayos de transferencia Western, cortada a aproximadamente 2,5 x 5,0 cm, se aplicaron 2 µl de soluciones que contenían diferentes concentraciones de peroxidasa de rábano (HRP) en 0,1 M Tampón Tris, pH 7,4 con adición de BSA (albúmina de suero bovino). Cada punto fue repetido cuatro veces. De esta manera, se creó una matriz de 4x7 puntos en la membrana. La membrana fue secada con aire y fue lavada dos veces con 0,1 M Tampón Tris, pH 7,4. Una vez seca, la membrana fue colocada en un portaobjetos de microscopio y fue insertada en un instrumento de obtención de imágenes (Nightowl, Berthold Technologies). A continuación, se preparó una solución de trabajo mezclando:

- 35
- 500 µl de solución A, preparada como en el Ejemplo 7
  - 500 µl de solución B, preparada como en el Ejemplo 7

y fue espolvoreada sobre la membrana. Se realizaron lecturas de diez segundos cada 5 minutos, durante media hora. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla siguiente:

40

## ES 2 388 007 T3

Nº de fila	Peroxidasa de rábano ( $\mu\text{g}$ )	Intensidad de señal (promedio de 4 puntos $\pm$ ds)
1	2,36E-03	701 $\pm$ 91
2	7,87E-04	404 $\pm$ 51
3	2,62E-04	192 $\pm$ 7,2
4	8,74E-05	79,8 $\pm$ 5,3
5	2,91E-05	30,4 $\pm$ 1,3
6	9,71E-06	19,2 $\pm$ 7,8
7	0	9,2 $\pm$ 2,9

Estos datos proporcionan un límite de detección para la peroxidasa de rábano (HRP) de aproximadamente 10 pg (200 fmol).

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento sintético de preparación de N-alquilsulfonatos de fenotiazina, **caracterizado porque** la síntesis consiste en:

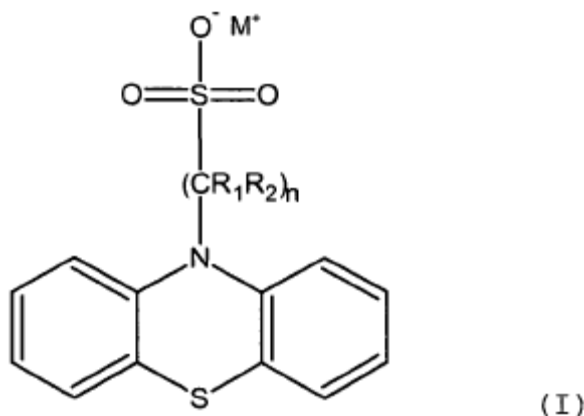
a. La preparación del anión de fenotiazina,

5 b. La reacción de dicho anión con un éster alquilsulfónico cíclico (sultona)

con la precipitación de dichos N-alquilsulfonatos de fenotiazina en forma cristalina,

en el que la etapa a. de preparación del anión de fenotiazina tiene lugar *in situ* en una solución que contiene tetrahidrofurano mediante la adición de una base y en la que dicho éster alquilsulfónico cíclico (sultona) está seleccionado de entre 1,3-propano sultona y 1,4-butano sultona.

10 2. Procedimiento sintético de preparación de N-alquilsulfonatos de fenotiazina según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dichos N-alquilsulfonatos de fenotiazina presentan la fórmula química (I)



en la que

$M^+$  es un catión monovalente, polivalente, orgánico o inorgánico, preferentemente  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,

$R_1$  y  $R_2$  son H y

25 n es igual a 3 ó 4.

3. Procedimiento sintético de preparación de N-alquilsulfonatos de fenotiazina según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicha base está seleccionada de entre hidruro de sodio, amida de sodio, butil litio, diisopropilamida de litio.

30 4. Procedimiento sintético de preparación de N-alquilsulfonato de fenotiazina según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicho N-alquilsulfonato es la sal sódica de 4-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato.

5. Procedimiento sintético de preparación de N-alquilsulfonato de fenotiazina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** dicho N-alquilsulfonato es la sal sódica de 4-(fenotiazin-10-il)butano-1-sulfonato.

35 6. Procedimiento sintético de preparación de N-alquilsulfonato de fenotiazina según la reivindicación 4, **caracterizado porque** el contenido de fenotiazina en dicho 4-(fenotiazin-10-il)propano-1-sulfonato de sodio es inferior a 0,0002 partes (mol/mol).

40 7. Procedimiento sintético de preparación de N-alquilsulfonato de fenotiazina según la reivindicación 5, **caracterizado porque** el contenido de fenotiazina en dicho 4-(fenotiazin-10-il)butano-1-sulfonato de sodio es inferior a 0,0002 partes (mol/mol).

