



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 324 509**

② Número de solicitud: 200800323

⑤ Int. Cl.:

**C12Q 1/28** (2006.01)

**G01N 21/76** (2006.01)

**G01N 33/535** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **06.02.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **07.08.2009**

Fecha de la concesión: **01.06.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **17.06.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**17.06.2010**

⑰ Titular/es: **Matilde Esther Lleonart Pajarín**  
**Passeig Vall d'Hebron, 60 – 7ª Esc. B**  
**08023 Barcelona, ES**  
**José Antonio Leal Parra**

⑱ Inventor/es: **Lleonart Pajarín, Matilde Esther y**  
**Leal Parra, José Antonio**

⑳ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑳ Título: **Composición de revelado en ensayos de inmunodetección.**

㉑ Resumen:

Composición de revelado en ensayos de inmunodetección.

La presente invención se refiere a una composición de revelado en ensayos de inmunodetección que comprende un compuesto de fórmula I, luminol, peróxido de hidrógeno y una solución tampón. Además la presente invención se refiere al uso de dicha composición en ensayos de inmunodetección.

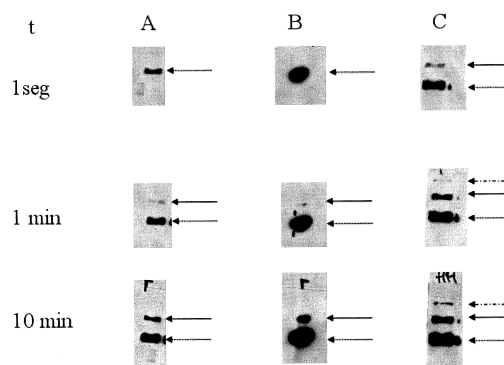


FIG. 1

ES 2 324 509 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

**DESCRIPCIÓN**

Composición de revelado en ensayos de inmunodetección.

**5 Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a una nueva composición para el revelado de muestras en membranas en ensayos de inmunodetección como el Western Blot.

10 Además se encuadra dentro del sector de técnica del desarrollo de nuevas metodologías de detección de muestras biológicas.

**Estado de la técnica**

15 El Western blot es una técnica de inmunodetección mediante la cual una proteína específica puede ser detectada y visualizada. Esta técnica se basa principalmente en la facultad de reconocimiento de los anticuerpos por los antígenos. En este mismo sentido dicha técnica se basa en que las proteínas a estudiar son separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren mediante electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa en papel. Desde este punto, las proteínas son estudiadas utilizando anticuerpos específicos para dicha proteínas. En este mismo sentido se emplea un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés. A continuación un segundo anticuerpo, marcado con una enzima, y contra la especie en la que se ha producido el primero, se emplea para localizar donde se formaron los complejos antígeno-anticuerpo. Este anticuerpo secundario se puede marcar de formas muy diversas con el fin de producir una señal detectable. Esta señal habitualmente es debida a un marcado con quimioluminiscencia. El revelado es mediante quimioluminiscencia mediante una reacción química de tal manera que se produce una señal luminosa. Para esta reacción se utiliza la peroxidasa de rábano (HRP) para catalizar la oxidación de luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol se encuentra en un estado excitado del que pasa a la situación basal, reducida, más estable, emitiendo luz. La luz emitida tiene una longitud de onda de 428 nm, con un máximo de emisión entre 15 y 20 minutos después de iniciada la reacción y una emisión que se puede prolongar de 2 a 3 horas.

30 Para el revelado de estas muestras, se utilizan composiciones de revelado bien conocidas en el estado de la técnica, como es el caso de la composición ECL de Amershan, que principalmente se compone de la mezcla de dos reactivos A y B, en donde A es el sustrato o luminol y el reactivo B que se trata de peróxido de hidrógeno en cantidades y proporciones bien definidas. En este mismo sentido existen otras muchas soluciones de revelado producidas por casas comerciales como Pierce (Supersignal) Perkin Elmer, Millipore... que básicamente se basan en la misma metodología.

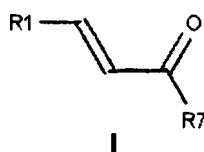
40 Sin embargo todas estas composiciones son bastante caras, no son muy sensibles y ofrecen una resolución moderada. Otro inconveniente de dichas soluciones es que el tiempo de exposición es muy variable dependiendo del anticuerpo en uso y de la cantidad de proteína cargada en el gel de poliacrilamida para efectuar el Western-Blot. Este inconveniente hace que muchos usuarios tengan que exponer su película al azar en tiempos escogidos aleatoriamente que no tienen porque ser los más adecuados para la visualización de la proteína en estudio. Con la composición aquí detallada, nosotros hemos comprobado para un panel de más de 20 anticuerpos testados, los tiempos de exposición son los mismos independientemente del anticuerpo utilizado o del extracto proteico a validar. Por lo tanto se hace necesario el desarrollo de nuevas composiciones de revelado que abaraten costes y sobre todo que tengan una mayor sensibilidad y resolución a la hora de identificar las bandas que puedan aparecer en un estudio llevado a cabo mediante la técnica de Western blot.

**Descripción de la invención**

50 La presente invención hace referencia a una nueva composición de revelado en ensayos de inmunodetección como es el caso del Western blot. Dicha nueva composición de revelado tiene la ventaja principal de obtener una mayor sensibilidad y resolución de los resultados mostrados en el momento de identificar las bandas que puedan aparecer en un estudio llevado a cabo mediante la técnica de Western blot, además de ser aproximadamente 100 veces más barato que el coste de las composiciones ya conocidas en el Estado de la Técnica.

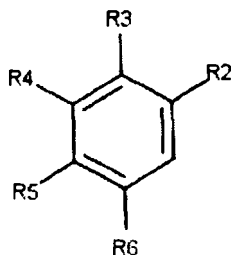
55 Por lo tanto un primer aspecto esencial de la presente invención hace referencia a una composición de revelado en ensayos de inmunodetección que comprende los siguientes componentes:

- Un compuesto de fórmula I:



## ES 2 324 509 B1

en donde R7 se sustituye por H, OH, -OCH<sub>3</sub> o -OCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, y R1 representa un compuesto de fórmula II:



y en donde R2, R3 y R6 independientemente son H, OH, SH, -CH<sub>3</sub> o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> y en donde R4 y R5 independientemente son H, OH, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub> o OCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>.

- Luminol.
- Peróxido de hidrógeno.
- Una solución tampón o buffer.

Una realización preferida de la presente invención, es en la que el compuesto de fórmula I y el compuesto de fórmula II se definen siendo:

- R7: -OH.
- R2 y R3: H.
- R4: OH o H.
- R5: H, OH o OCH<sub>3</sub>.
- R6: H o OH.

Otra realización preferida de la presente invención, es aquella en la que el compuesto de fórmula I y el compuesto de fórmula II se definen siendo:

- R7: -OH.
- R2 y R3: H.
- R4: OH.
- R5: H.
- R6: H.

Otra realización preferida de la presente invención, es aquella en la que el compuesto de fórmula I y el compuesto de fórmula II se definen siendo:

- R7: -OH.
- R2 y R3: H.
- R4: OH.
- R5: OCH<sub>3</sub>.
- R6: H.

## ES 2 324 509 B1

Otra realización preferida de la presente invención, es aquella en la que el compuesto de fórmula I y el compuesto de fórmula II se definen siendo:

5 - R7: -OH.

- R2 y R3: H.

- R4: H.

10 - R5: H.

- R6: OH.

15 Otra realización preferida de la presente invención, es aquella en la que el compuesto de fórmula I y el compuesto de fórmula II se definen siendo:

- R7: -OH.

20 - R2 y R3: H.

- R4: H.

- R5: H.

25 - R6: H.

30 Según otra realización preferida la composición de revelado en ensayos de inmunodetección comprende los componentes anteriormente descritos en las siguientes proporciones:

- Compuesto de fórmula I está presente en una concentración desde 0,1 a 0,45 mM preferentemente desde 0,2 a 0,255 mM.

35 - Luminol en una concentración desde 1,25 a 8,75 mM preferentemente desde 1,25 a 4,05 mM.

- Peróxido de hidrógeno al 30% en un rango desde el 0,01 al 1%. preferentemente desde 0,01 a 0,1%.

40 - Una solución tampón o buffer de Tris (1,5M) en un rango desde 0,05 a 0,8 M. preferiblemente desde 0,05 a 0,2 M.

45 Según otra realización preferida la composición de revelado en ensayos de inmunodetección comprende los componentes anteriormente descritos en las siguientes proporciones:

- Compuesto de fórmula I está presente en una concentración desde 0,1 a 0,45 mM preferentemente desde 0,2 a 0,255 mM.

- Luminol en una concentración desde 1,25 a 8,75 mM. preferentemente desde 1,25 a 4,05 mM.

50 - Peróxido de hidrógeno al 30% en un rango desde el 0,01 al 1% preferentemente desde 0,01 a 0,1%.

- Una solución tampón o buffer de EDTA en un rango desde 0,03 a 0,30 M preferentemente 0,03 a 0,09 M.

55 Un segundo aspecto esencial de la presente invención hace referencia al uso de la composición de revelado en ensayos de inmunodetección, preferentemente en Western blot.

### Breve descripción de las figuras

60 Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la presente invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, películas reales de radiografías con carácter ilustrativo y no limitativo.

65 La figura 1.- Muestra un estudio comparativo entre distintos reactivos de revelado de distintas casas comerciales del mismo extracto proteico tratado en paralelo con la única variación del sistema de revelado. Los laboratorios a comparar fueron: ECL de Amersham (bandas A), Supersignal de Pierce (bandas B) y el resultado tras utilizar la nueva composición descrita en la presente invención (bandas C). Para ello se hibridaron extractos celulares con el

anticuerpo de beta-actina tal y como se detalla con posterioridad. En la figura se muestra como desde el primer segundo de exposición a la composición de revelado aparece una banda nueva (flecha negra delgada) que no aparece a ningún tiempo para el resto de las composiciones. La nueva banda, marcada por la flecha negra, aunque de carácter inespecífico demuestra el alto poder resolutivo o sensibilidad de la composición aquí expuesta. La sensibilidad de la composición descrita en esta invención, igualmente demuestra a tiempo de un minuto, la aparición de una segunda banda inespecífica (flecha negra discontinua) que tampoco se aprecia en ninguna de las otras dos composiciones. Así mismo la banda específica (flecha negra punteada), demuestra que la composición descrita (panel C) es unas 10 veces mayor que el panel A. Si comparamos la composición (panel C) con el panel B, la localización exacta de la proteína es más específica en la composición descrita en la presente invención. Dado que la mayoría de las proteínas celulares se expresan en menor grado de expresión que la beta-actina, este ejemplo es representativo de que con la composición objeto de la presente invención, el poder de resolución es mayor.

### Ejemplos de realización

15 A la vista de la figura reseñada, se procede a describir de forma detallada la presente invención:

Se compararon la eficiencia de dos reactivos de revelado comerciales de las casa Amersham (ECL) y Pierce (Supersignal) en comparación con la composición objeto de la presente invención. Dicho reactivo se ha estado testando y evaluando durante más de 6 meses, periodo en el cual se han testado más de 20 anticuerpos, y que verifican por tanto la estabilidad de los reactivos preparados en varias concentraciones de almacenaje a 4°C y a -20°C. En este sentido, se llevó a cabo el siguiente experimento:

Extractos proteicos de la línea celular NIH3T3 que se encontraba creciendo en cultivos (libre de micoplasma y en fase exponencial) fueron extraídos con un buffer de tisis convencional de extracción de proteínas. Dichos extractos se corrieron en un gel al 12% de poliacrilamida al mismo tiempo (a 120 v durante 2 h). Posteriormente el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (en la misma membrana y bajo las mismas condiciones (400 mA durante 1,15 h). Después del proceso de transferencia, la membrana se bloqueó con TNT-leche al 5% de acuerdo con protocolos estándar, se hibridó durante 14 h con el anticuerpo primario de beta-actina (Sigma-Aldrich) proteína de elevada expresión que se utilizó como control positivo, posteriormente la membrana se lavó extensamente durante 30 min; se incubó durante una hora con anticuerpo secundario "horse-peroxidase-labelled anti-mouse" (Amersham or Promega ref.NA9310V), posteriormente se lavó durante 30 min y se cortó en diferentes partes y cada una de ellas se reveló con una composición diferente.

En relación a la figura 1, se resalta la especificidad dada por la composición objeto de la presente invención (panel C), aunque el reactivo proporcionado por Pierce (panel B) pueda parecer igualmente sensible al nuestro (panel C), este último es en cierta medida artefactual por varios motivos:

- a) La señal de expresión proteica se manifiesta de forma ovalada a 1 seg de exposición, en lugar del típico patrón de proteínas (forma alargada tal y como demuestran los paneles A y C), tras haber migrado de forma homogénea en la electroforesis
- b) La señal de expresión proteica a 1 min. y 10 min. de exposición, va más allá de la exacta localización de la proteína. Es decir, la membrana correspondiente al panel C, fue recortada por donde indica el marcador en 1 min. y 10 min. de exposición, por tanto la señal que se ve a la izquierda de la marca realizada una vez la película fue revelada, indica señal artefactual que no es proporcional a la exacta localización de la proteína en la membrana. A 10 min. de exposición, se aprecia claramente en el panel B, una señal "añadida" sobre la forma ovalada que representa la señal principal.

Nuestra composición (panel C), si bien en cierta medida comparable en intensidad al panel B, no proporciona dicho artefacto a la hora de evaluar expresión proteica.

55

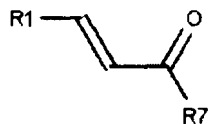
60

65

REIVINDICACIONES

1. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección **caracterizada** porque comprende los siguientes elementos:

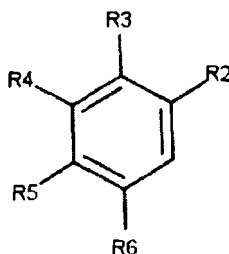
a. un compuesto de fórmula general I:



I

en el que R7 es H, OH, -OCH<sub>3</sub> o -OCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>; y

en el que R1 es un compuesto de fórmula general II:



II

en el que R2, R3 y R6 independientemente son H, OH, SH, -CH<sub>3</sub> o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>; y

en el que R4 y R5 independientemente son H, OH, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub> o -OCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>;

b. luminol;

c. peróxido de hidrógeno al 30%; y

d. una solución tampón.

2. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según la reivindicación 1, **caracterizada** porque R7 es OH, R2 y R3 son H, R4 es OH o H, R5 es H, OH o OCH<sub>3</sub> y R6 es H o OH.

3. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según la reivindicación 2, **caracterizada** porque R7 es OH, R2 y R3 son H, R4 es OH, R5 es H y R6 es H.

4. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según la reivindicación 2, **caracterizada** porque R7 es OH, R2 y R3 son H, R4 es OH, R5 es -OCH<sub>3</sub> y R6 es H.

5. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según la reivindicación 2, **caracterizada** porque R7 es OH, R2 y R3 son H, R4 es H, R5 es H y R6 es OH.

6. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según la reivindicación 2, **caracterizada** porque R7 es OH, R2 y R3 son H, R4 es H, R5 es H y R6 es H.

7. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la solución tampón es Tris.

8. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la solución tampón es EDTA.

## ES 2 324 509 B1

9. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el compuesto de fórmula I tiene una concentración de 0,1 a 0,45 mM, preferentemente desde 0,2 a 0,255 mM.

5 10. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el luminol tiene una concentración de 1,25 a 8,75 mM, preferiblemente de 1,25 a 4,05 mM.

11. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el peróxido de hidrógeno tiene una concentración del 0,01 al 1%, preferiblemente de 0,01 a 0,1%.

10 12. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 y 7, **caracterizada** porque la solución tampón tiene una concentración de 0,05 a 0,8 M, preferiblemente de 0,05 a 0,2 M.

15 13. Composición de revelado en ensayos de inmunodetección según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 y 8, **caracterizada** porque la solución tampón tiene una concentración de 0,03 a 0,30 M preferiblemente de 0,03 a 0,09 M.

14. Uso de la composición de la reivindicación 1, para ensayos de inmunodetección.

20 15. Uso de la composición de la reivindicación 1, para ensayos de Western Blot.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

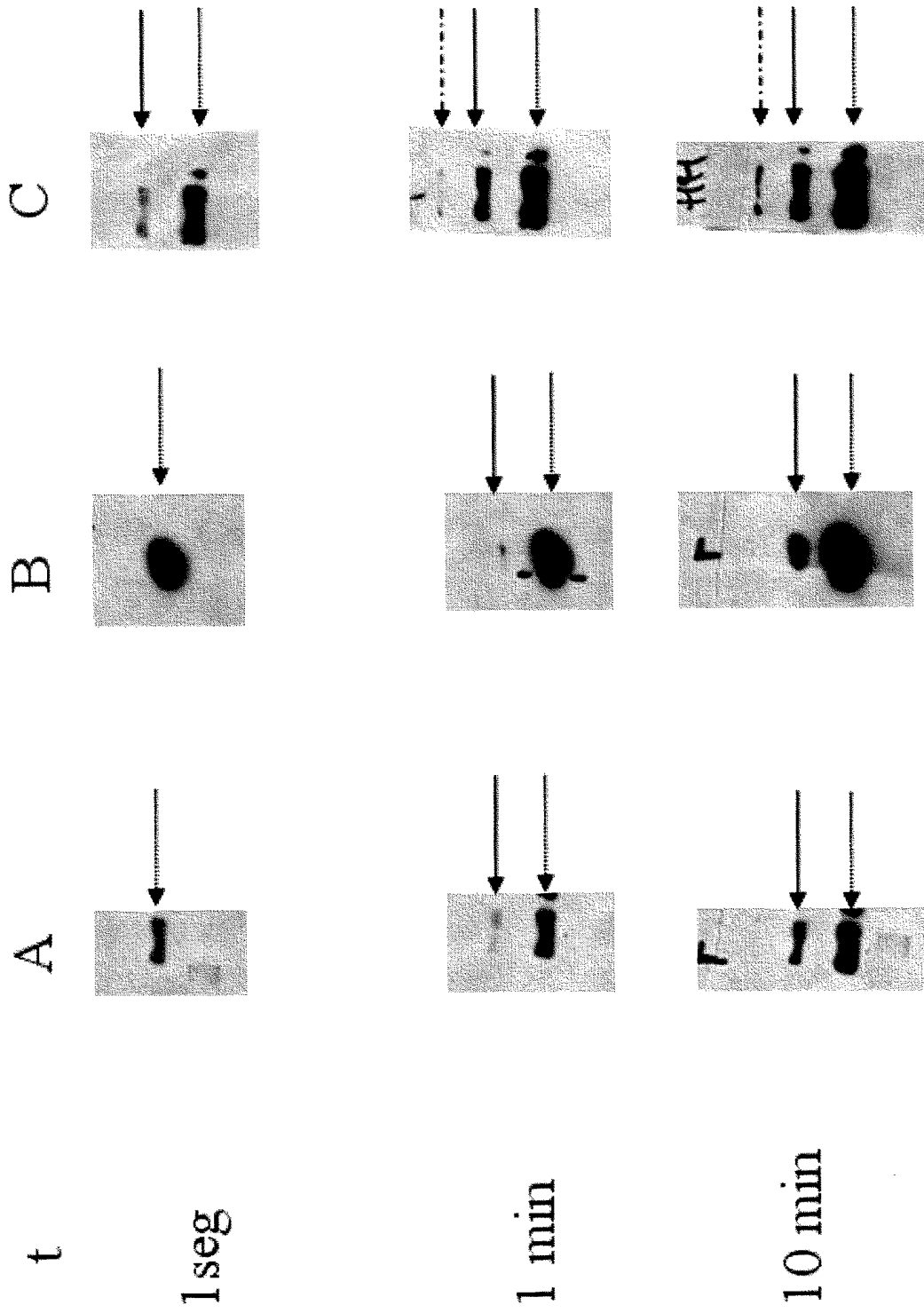


FIG. 1



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 324 509

② Nº de solicitud: 200800323

③ Fecha de presentación de la solicitud: **06.02.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5629168 A (KRICKA) 13.05.1997, columna 1, líneas 10-26,42-52; columna 2, líneas 1-15; columna 4, línea 61 - columna 5, línea 20; columna 5, líneas 44-46; ejemplo 1.	1-15
A	US 6432662 B1 (DAVIS et al.) 13.08.2002, columna 1, líneas 5-62; columna 2, líneas 30-45; columna 3, líneas 1-6; columna 3, línea 65 - columna 4, línea 26.	1-15
A	US 5424194 A (OTAGIRI et al.) 13.06.1995, columna 1, líneas 40-65; columna 3, líneas 6-57; columna 4, líneas 4-40.	1-15
A	US 4842997 A (CARTER et al.) 27.06.1989, columna 1, líneas 5-29; columna 2, líneas 17-25,37-42; columna 3, líneas 56-68.	1-15

**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 nº:

<p><b>Fecha de realización del informe</b> 08.06.2009</p>	<p><b>Examinador</b> S. González Peñalba</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	-----------------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12Q 1/28** (2006.01)

**G01N 21/76** (2006.01)

**G01N 33/535** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.06.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 5629168	13.05.1997
D02	US 6432662	13.08.2002
D03	US 5424194	13.06.1995
D04	US 4842997	27.06.1989

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere a una composición de revelado para ensayos de inmunodetección, como por ejemplo ensayos de Western Blot, que comprende un compuesto de fórmula I, luminol, peróxido de hidrógeno y una solución tampón.

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (LP ARTS. 6 Y 8)**

El documento D01 hace referencia a una reacción quimioluminiscente mejorada para ensayos inmunológicos como Western Blot llevada a cabo por una composición que comprende luminol, peróxido de hidrógeno, peroxidasa de rábano (HRP) y un compuesto orgánico de boro .

El documento D02 se refiere a una solución para ensayos de quimioluminiscencia tales como Western Blotting que comprende luminol, peróxido de hidrógeno, peroxidasa de rábano y un compuesto potenciador de la luminiscencia acínico.

El documento D03 hace referencia a una reacción quimioluminiscente utilizada para inmunoensayos llevada a cabo por la composición formada por luminol, peróxido de hidrógeno, peroxidasa de rábano y un compuesto tal como (4-cianometiltio)fenol.

El documento D04 se refiere a inmunoensayos, basados en reacciones de quimioluminiscencia llevadas a cabo por la composición que comprende enzima peroxidasa de rábano, luminol, peróxido de hidrógeno y un compuesto 6-hidroxibenzotiazol.

Ninguno de los documentos citados considerados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-15. Además, en los documentos citados no existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-15 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con la LP, arts. 6 y 8.