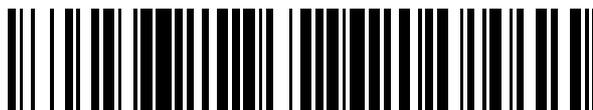


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 232**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01933052 .1**
96 Fecha de presentación: **03.05.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1305632**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2003**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE MÚLTIPLES ANALITOS.**

30 Prioridad:
04.05.2000 US 564230

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.12.2011

73 Titular/es:
**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH
GÖRZHÄUSER HOF EMIL-VON-BEHRING-
STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:
**PEASE, John, S.;
CROMER, Remy;
PATEL, Rajesh;
KURN, Nurith y
DE KECZER, Steve**

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 370 232 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección de múltiples analitos

5 **Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención.

10 Esta invención se refiere a métodos para detectar más de dos componentes diferentes en un único medio de prueba.

15 El campo del diagnóstico clínico ha mostrado una amplia expansión en los últimos años, tanto con respecto a la variedad de materiales de interés que pueden determinarse de manera fácil y precisa, así como a los métodos para la determinación. Se desean medios convenientes, fiables y no peligrosos para detectar la presencia de bajas concentraciones de materiales en líquidos. En química clínica, estos materiales pueden estar presentes en fluidos corporales en concentraciones por debajo de 10^{-12} molar. La dificultad de detectar bajas concentraciones de estos materiales se potencia por los tamaños de muestra relativamente pequeños que pueden utilizarse.

20 La necesidad de determinar múltiples analitos en la sangre y otros fluidos biológicos resulta cada vez más evidente en muchas ramas de la medicina. En endocrinología, se requiere a menudo el conocimiento de la concentración plasmática de varias hormonas diferentes para solucionar un problema de diagnóstico o un panel de marcadores para un diagnóstico dado en el que las razones pueden ayudar en la determinación de la evolución de la enfermedad. Es evidente una necesidad incluso más urgente en otras áreas tales como pruebas de alergia, el examen de sangre transfundida para determinar la contaminación viral o el diagnóstico genético.

25 Uno cualquiera de varios agentes infecciosos puede provocar algunos estados de enfermedad patológicos. En otros casos, el diagnóstico y la evaluación de los estados de enfermedad pueden evaluarse mejor mediante la medición de varios analitos en una muestra, tal como un panel de citocinas y quimiocinas, un panel de marcadores de enfermedad específicos de tejido, un panel de antígenos y anticuerpos de diagnóstico y similares. Otro ejemplo de la utilidad del análisis simultáneo de múltiples analitos es la determinación del nivel de expresión de un panel de genes en una población de células dada o la detección y cuantificación simultánea de múltiples secuencias de ácido nucleico en una muestra individual. Otros beneficios de la detección y cuantificación simultánea de múltiples analitos son el posible aumento en el rendimiento del análisis y la capacidad de incorporar controles internos para la muestra de prueba.

30 En otros ensayos tales como ensayos de hibridación de ácido nucleico, existe la necesidad de detectar y cuantificar una secuencia control positiva y diana específica en un único tubo sin etapas de transferencia y separaciones que llevan mucho tiempo. En principio, los controles internos eliminarán la necesidad de una curva patrón. La amplificación y detección en un único tubo sin abrir el tubo también supera los problemas de contaminación. En el análisis de mutación, la capacidad de medir dos o más variantes en un único tubo permitiría monitorizar cuantitativamente la aparición de poblaciones mutantes.

35 La mayoría de los ensayos de múltiples analitos son heterogéneos, tienen escasa sensibilidad y un rango dinámico escaso (se determina una diferencia de 2 a 100 veces en la concentración de los analitos) y algunos requieren el uso de instrumentación sofisticada. Un ensayo homogéneo que tenga sensibilidad superior, rango dinámico grande (diferencia de 10^3 a 10^4 veces en la concentración de analito) y menos reactivos y más estables podría aumentar la simplicidad y fiabilidad o ensayos de múltiples analitos.

40 Los compuestos luminiscentes, tales como compuestos fluorescentes y compuestos quimioluminiscentes, encuentran amplia aplicación en el campo de ensayo debido a su capacidad para emitir luz. Por este motivo, se han utilizado agentes luminiscentes como marcadores en ensayos tales como inmunoensayos y ensayos de ácido nucleico. Por ejemplo, un miembro de un par de unión específica se conjuga con un agente luminiscente y se emplean diversos protocolos. El conjugado de agente luminiscente puede repartirse entre una fase sólida y una fase líquida en relación a la cantidad de analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito. Midiendo la luminiscencia de cualquiera de las fases, puede relacionarse el nivel de luminiscencia observada con una concentración del analito en la muestra.

45 Los sistemas anteriormente descritos para la detección y cuantificación simultánea de múltiples analitos en una única muestra o múltiples análisis se basan en múltiples grupos indicadores que corresponden cada uno a un analito específico. Se han usado diversos marcadores para producir señales distinguibles en ensayos de múltiples analitos: (a) dos marcadores de radioisótopos diferentes, (b) dos o más marcadores fluorescentes diferentes, (c) un marcador quimioluminiscente y uno fluorescente, (c) quelatos de lantánido diferentes en los que se miden tanto el tiempo de vida como la longitud de onda, (e) una enzima y un éster de acridinio, (f) resolución espacial de diferentes analitos, (g) diferentes enzimas con adiciones de sustrato secuenciales y (h) diferentes ésteres de acridinio que producen dioxetanonas que tienen diferentes tiempos de vida.

En otro enfoque, se emplea un único grupo indicador que reacciona diferencialmente con diversos analitos para producir multiplicidad de señales. Cuando el análisis implica múltiples señales en una única mezcla de reacción, las señales pueden resolverse basándose en la diferencia de longitud de onda y o diferencias en la semivida de emisión.

5

2. Breve descripción de la técnica relacionada.

La patente estadounidense n.º 5.656.207 (Woodhead, *et al.*) (Woodhead I) da a conocer un método para detectar o cuantificar múltiples analitos usando técnicas de marcaje.

10

Se dan a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 5.827.656 (Nelson, *et al.*) (Nelson I) y 5.658.737 (Nelson, *et al.*) (Nelson II) composiciones y métodos para la detección y cuantificación simultánea de múltiples secuencias de ácido nucleico específicas.

15

La patente estadounidense n.º 5.395.752 (Law, *et al.*) da a conocer compuestos quimioluminiscentes de larga longitud de onda de emisión y su uso en los ensayos de prueba.

Chandler, *et al.*, tratan el análisis multiplexado de muestras clínicas, el aparato y el método en el documento PCT WO 97/14028.

20

Se describe un ensayo multiplexado sensible, rápido para la detección de ácidos nucleicos virales usando el sistema FlowMetrix de Smith, *et al.*, en *Clinical Chemistry* (1998) 44(9):2054-2056.

25

Narang, *et al.*, trata la detección de múltiples analitos usando un inmunosensor de flujo basado en capilares (*Analytical Biochemistry* (1998) 255:13-19).

Se describe el análisis multiparamétrico rápido de la simulación celular en reacciones de cultivo de linfocitos mixtos por Traganos, *et al.*, en *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (1977) 25(7):881-887).

30

La patente estadounidense n.º 5.340.716 (Ullman, *et al.*) describe un método de ensayo que utiliza marcadores quimioluminiscentes fotoactivados.

Se describen en la patente estadounidense n.º 5.709.994 (Pease, *et al.*) matrices quimioluminiscentes fotoactivables.

35

El documento WO 99/42618 se refiere a un método para detectar la cantidad de un polinucleótido diana (es decir, uno) en una muestra.

Clinical Chemistry, vol. 42, n.º 9, 1996, 1518-1526, "Luminescent oxygen channeling assay (LOCI™): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method", documento XP-002109518, da a conocer la detección de un único analito en un medio usando un compuesto quimioluminiscente y un sensibilizador.

40

El documento WO 01/12859, una solicitud anterior, sugiere un método para la detección de una diferencia en un único analito.

45

Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 91, págs. 5426-5430, junio de 1994, "Luminescent oxygen channeling immunoassay: Measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence", documento XP-000882828, se refiere a un ensayo que usa un sensibilizador que genera oxígeno singlete y un reactivo quimioluminiscente reactivo que puede activarse mediante el oxígeno singlete.

50

Sumario de la invención

Un aspecto de la presente invención es un método para determinar la presencia o las cantidades relativas de más de dos analitos diferentes que se sospecha que están en un medio, comprendiendo dicho método:

55

a) proporcionar en combinación (1) un medio que se sospecha que contiene dichos más de dos analitos diferentes, (2) al menos dos reactivos sensibilizadores, pudiendo dichos reactivos sensibilizadores generar oxígeno singlete y pudiendo distinguirse entre sí mediante longitud de onda de sensibilización, y (3) múltiples reactivos que son reactivos que son composiciones quimioluminiscentes y que pueden activarse mediante oxígeno singlete y que pueden detectarse diferencialmente mediante diferentes longitudes de onda de emisión o mediante diferentes razones de descomposición y que están asociados con un miembro sbp que puede unirse con un analito, en el que un primer miembro de par de unión específica (sbp) está asociado con cada uno de dichos reactivos sensibilizadores y en los que, para cada uno de dichos reactivos sensibilizadores, dicho primer miembro sbp puede unirse a un analito respectivo o a un segundo miembro sbp para formar un complejo relacionado con la cantidad de dicho analito, y

60

b) activar diferencialmente dichos reactivos sensibilizadores y detectar la cantidad de señal generada como

65

resultado de la activación de cada uno de dichos reactivos que son reactivos, estando la cantidad de la misma relacionada con la cantidad de cada uno de dichos analitos diferentes en dicho medio.

5 Otra realización de la presente invención es un método homogéneo según la reivindicación 8 para determinar la presencia o las cantidades relativas de más de dos analitos diferentes que se sospecha que están en un medio, comprendiendo dicho método:

10 a) proporcionar en combinación (1) un medio que se sospecha que contiene dichos más de dos analitos, (2) un fotosensibilizador para cada uno de dichos analitos, estando cada uno de dichos fotosensibilizadores asociado con una primera partícula y generando oxígeno singlete y teniendo una longitud de onda de sensibilización diferente entre sí, y (3) composiciones quimioluminiscentes que pueden activarse mediante oxígeno singlete, asociándose cada una de éstas con una segunda partícula, en el que dichas composiciones quimioluminiscentes pueden detectarse diferencialmente mediante diferentes longitudes de onda de emisión o mediante diferentes razones de descomposición y en el que las diferentes longitudes de onda de sensibilización y las diferentes longitudes de onda de emisión o diferentes razones de descomposición dan como resultado la detección diferencial de cada uno de dichos analitos y en el que cada uno de dichos fotosensibilizadores está asociado con un primer miembro de par de unión específica (sbp) y en el que, para cada uno de dichos fotosensibilizadores, dicho primer miembro sbp puede unirse a un analito respectivo o a un segundo miembro sbp para formar un complejo relacionado con la cantidad de dicho analito, y

20 b) irradiar diferencialmente cada uno de dichos fotosensibilizadores con luz y detectar la cantidad de luminiscencia generada por cada una de dichas composiciones quimioluminiscentes en un tiempo tras la activación y a una longitud de onda que corresponde a la razón de descomposición y longitud de onda de dicha emisión luminiscente, estando relacionada la cantidad de la misma con la cantidad de cada uno de dichos diferentes analitos en dicho medio.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 es una representación esquemática de un esquema de ensayo.

La figura 2 es un gráfico que representa curvas patrón.

La figura 3 es una representación esquemática de un esquema de ensayo.

35 La figura 4 es un gráfico que representa curvas patrón.

La figura 5 es un gráfico que representa curvas patrón.

Descripción de las realizaciones específicas

40 La presente invención permite la detección cuantitativa de más de dos analitos diferentes en un ensayo mediante el uso de diferentes reactivos sensibilizadores que habitualmente pueden activarse diferencialmente mediante la diferencia en longitud de onda de sensibilización. Preferiblemente, el reactivo sensibilizador puede generar oxígeno singlete. También se emplean reactivos que son reactivos que pueden activarse como resultado de la activación de los reactivos sensibilizadores, que pueden activarse habitualmente mediante oxígeno singlete. Mientras que los métodos homogéneos basados en fluorescencia o quimioluminiscencia anteriores o para el análisis múltiple se basan en la resolución de señales específicas basándose en las tasas de descomposición y/o longitud de onda de emisión, el presente método se basa en la distinción de señales específicas basándose en las longitudes de onda de iluminación para la sensibilización de los sensibilizadores específicos. Los reactivos que son reactivos pueden ser agentes quimioluminiscentes, fluorescentes, precursores de indicadores fotoactivos y similares o combinaciones de los mismos. Otros aceptores que producen señales que se activan mediante reacción con oxígeno singlete también puede usarse en el análisis múltiple de la presente invención. La combinación de múltiples sensibilizadores y múltiples aceptores adecuados permite la multiplexación adicional del análisis.

55 Antes de seguir adelante con una descripción de las realizaciones específicas de la presente invención, se definirán y se describirán en detalle varios términos .

60 Componente - componente de interés; el compuesto o composición que va a detectarse. El componente puede ser un analito, un compuesto de referencia, un compuesto de control, un calibrador y similares.

Analito - el analito está compuesto habitualmente por un miembro de un par de unión específica (sbp) y puede ser un ligando, que es monovalente (monoepitopico) o polivalente (poliepitopico), habitualmente antigénico o hapténico, y es un único compuesto o una pluralidad de compuestos que comparten al menos un sitio determinante o epitopico común. El analito puede ser una parte de una célula tal como una bacteria o una célula que porta un antígeno de grupo sanguíneo tal como A, B, D, etc., o un antígeno HLA o el analito puede ser un microorganismo, por ejemplo, bacteria, hongo, protozoo o virus.

Los analitos de ligandos polivalentes serán normalmente poli(aminoácidos), es decir, polipéptidos y proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos. Tales combinaciones incluyen componentes de bacterias, virus, cromosomas, genes, mitocondrias, núcleos, membranas celulares y similares.

- 5 Para la mayor parte, los analitos de ligandos poliepitopicos a los que puede aplicarse la invención objeto tendrán un peso molecular de al menos aproximadamente 5.000, más habitualmente al menos aproximadamente 10.000. En la categoría de poli(aminoácido), los poli(aminoácidos) de interés tendrán generalmente un peso molecular de desde aproximadamente 5.000 hasta 5.000.000, más habitualmente un peso molecular de desde aproximadamente 20.000 hasta 1.000.000; entre las hormonas de interés, los pesos moleculares oscilarán habitualmente entre
10 aproximadamente 5.000 y 60.000 de peso molecular.

Una amplia variedad de proteínas puede considerarse como la familia de proteínas que tienen características estructurales similares, proteínas que tienen funciones biológicas particulares, proteínas relacionadas con microorganismos específicos, particularmente microorganismos que provocan enfermedades, etc. Tales proteínas
15 incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas, citocinas, enzimas, hormonas, antígenos de cáncer, marcadores nutricionales, antígenos específicos de tejido, etc. Tales proteínas incluyen, a modo de ilustración y no limitación, protaminas, histonas, albúminas, globulinas, escleroproteínas, fosfoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, glicoproteínas, receptores de células T, proteoglicanos, HLA, proteínas no
20 clasificadas, por ejemplo, somatotropina, prolactina, insulina, pepsina, proteínas encontradas en el plasma humano, factores de coagulación sanguínea, hormonas proteicas tales como, por ejemplo, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, luteotropina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormonas tisulares, citocinas, antígenos de cáncer tales como, por ejemplo, PSA, CEA, a-fetoproteína, fosfatasa ácida, CA19.9 y CA125, antígenos específicos de tejido, tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina, mioglobina, CPK-MB y calcitonina, y hormonas peptídicas. Otros materiales poliméricos de interés son mucopolisacáridos y polisacáridos.

25 Los analitos de ligandos monoepitopicos tendrán generalmente un peso molecular de desde 100 hasta 2.000, más habitualmente un peso molecular de desde 125 hasta 1.000. Los analitos incluyen fármacos, metabolitos, pesticidas, contaminantes y similares. Se incluyen entre los fármacos de interés los alcaloides. Entre los alcaloides están
30 alcaloides de morfina, que incluyen morfina, codeína, heroína, dextrometorfano, sus derivados y metabolitos; alcaloides de cocaína, que incluyen cocaína y bencilecgonina, sus derivados y metabolitos; alcaloides del cornezuelo del centeno, que incluyen la dietilamida del ácido lisérgico; alcaloides esteroides; alcaloides de iminazoilo; alcaloides de quinazolina; alcaloides de isoquinolina; alcaloides de quinolina, que incluyen quinina y quinidina; alcaloides de diterpeno, sus derivados y metabolitos.

35 El siguiente grupo de fármacos incluye esteroides, que incluye los estrógenos, andrógenos, esteroides androocorticales, ácidos biliares, glucósidos cardiotónicos y agliconas, que incluye digoxina y digoxigenina, saponinas y sapogeninas, sus derivados y metabolitos. También están incluidas las sustancias miméticas esteroides, tales como dietilestilbestrol.

40 El siguiente grupo de fármacos es el de las lactamas que tienen desde 5 hasta 6 miembros de anillo, que incluye los barbituatos, por ejemplo, fenobarbital y secobarbital, difenilhidantoína, primidona, etosuximida y sus metabolitos.

El siguiente grupo de fármacos es el de los aminoalquilbencenos, con alquilo de desde 2 hasta 3 átomos de carbono, que incluye las anfetaminas; catecolaminas, que incluye efedrina, L-dopa, epinefrina; narceína; papaverina; y metabolitos de los anteriores.
45

El siguiente grupo de fármacos es el de los benzheterocíclicos, que incluyen oxazepam, clorpromazina, tegretol, sus derivados y metabolitos, siendo los anillos heterocíclicos azepinas, diazepinas y fenotiazinas.

50 El siguiente grupo de fármacos es el de las purinas, que incluye teofilina, cafeína, sus metabolitos y derivados.

El siguiente grupo de fármacos incluye los derivados de la marihuana, que incluye cannabinal y tetrahidrocannabinol.

55 El siguiente grupo de fármacos es el de las hormonas tales como tiroxina, cortisol, triyodotironina, testosterona, estradiol, estrona, progesterona, polipéptidos tales como angiotensina, LHRH, e inmunosupresores tales como ciclosporina, FK506, ácido micofenólico, etcétera.

El siguiente grupo de fármacos incluye las vitaminas tales como A, B, por ejemplo B12, C, D, E y K, ácido fólico, tiamina.
60

El siguiente grupo de fármacos es el de las prostaglandinas, que difieren en el grado y los sitios de hidroxilación e insaturación.

65 El siguiente grupo de fármacos es el de los antidepresivos tricíclicos, que incluye imipramina, dismetilimipramina, amitriptilina, nortriptilina, protriptilina, trimipramina, clomipramina, doxepina y desmetildoxepina.

El siguiente grupo de fármacos es el de los antineoplásicos, que incluyen metotrexato.

El siguiente grupo de fármacos es el de los antibióticos, que incluyen penicilina, cloromicetina, actinomicetina, tetraciclina, terramicina, los metabolitos y derivados.

5 El siguiente grupo de fármacos es el de los nucleósidos y nucleótidos, que incluyen ATP, NAD, FMN, adenosina, guanosina, timidina y citidina con sus sustituyentes de fosfato y azúcar apropiados.

10 El siguiente grupo de fármacos es el de diversos fármacos individuales que incluyen metadona, meprobamato, serotonina, meperidina, lidocaína, procainamida, acetilprocainamida, propranolol, griseofulvina, ácido valproico, butirofenonas, antihistaminas, cloranfenicol, fármacos anticolinérgicos, tales como atropina, sus metabolitos y derivados.

15 Metabolitos relacionados con los estados de enfermedad incluyen espermina, galactosa, ácido fenilpirúvico y porfirina tipo 1.

El siguiente grupo de fármacos es el de los aminoglucósidos, tales como gentamicina, kanamicina, tobramicina y amikacina.

20 Entre los pesticidas de interés están bifenilos polihalogenados, ésteres de fosfato, tiofosfatos, carbamatos, sulfenamidas polihalogenadas, sus metabolitos y derivados.

25 Para los analitos receptores, los pesos moleculares generalmente oscilarán entre 10.000 y 2×10^8 , más habitualmente entre 10.000 y 10^6 . Para las inmunoglobulinas, IgA, IgG, IgE e IgM, los pesos moleculares generalmente variarán desde aproximadamente 160.000 hasta aproximadamente 10^6 . Las enzimas normalmente oscilarán desde entre 10.000 y 1.000.000 en peso molecular. Los receptores naturales varían ampliamente, teniendo generalmente un peso molecular de al menos aproximadamente 25.000 y pueden tener un peso molecular de 10^6 o superior, incluyendo materiales tales como avidina, ADN, ARN, globulina de unión a tiroxina, prealbúmina de unión a tiroxina, transcortina, etc.

30 El término analito incluye además analitos de polinucleótido tales como los polinucleótidos definidos a continuación. Estos incluyen ARN-m, ARN-r, ARN-t, ADN, dúplex de ADN-ARN, etc. El término analito también incluye receptores que son agentes de unión a polinucleótidos, tales como, por ejemplo, enzimas de restricción, activadores, represores, nucleasas, polimerasas, histonas, enzimas de reparación, agentes quimioterápicos y similares.

35 El analito puede ser una molécula encontrada directamente en una muestra tal como tejido biológico, incluyendo fluidos corporales, de un huésped. La muestra puede examinarse directamente o puede tratarse previamente para hacer que el analito pueda detectarse más fácilmente. Además, el analito de interés puede determinarse detectando un agente probatorio del analito de interés tal como un miembro de par de unión específica complementario al analito de interés, cuya presencia se detectará sólo cuando el analito de interés esté presente en una muestra. Por tanto, el agente probatorio del analito se convierte en el analito que se detecta en un ensayo. El tejido biológico incluye tejido extirpado de un órgano u otra parte del cuerpo de un huésped y fluidos corporales, por ejemplo, orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputos, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, mucosidad y similares.

45 Sensibilizador - una molécula, habitualmente un compuesto, que puede activarse para formar un producto, tal como oxígeno singlete, que puede activar un reactivo que es reactivo. Los sensibilizadores útiles en la presente invención pueden activarse diferencialmente tal como teniendo diferentes longitudes de onda de activación o diferentes modos de activación. El sensibilizador puede fotoactivarse (por ejemplo, compuestos aromáticos y colorantes) o puede quimioactivarse (por ejemplo, enzimas y sales de metal). Preferiblemente, el sensibilizador es un fotosensibilizador. Sin embargo, otros sensibilizadores incluyen, a modo de ejemplo y no limitación, otras sustancias y composiciones que pueden producir oxígeno singlete con o, menos preferiblemente, sin activación mediante una fuente de luz externa. Por tanto, por ejemplo, se ha mostrado que las sales de molibdato (MoO_4^-) y cloroperoxidasa y mieloperoxidasa más ión cloruro o bromuro (Kanofsky, J. Biol. Chem. (1983) 259:5596) catalizan la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno singlete y agua. Cualquiera de estas composiciones puede, por ejemplo, estar incluida en partículas en las que se une un miembro sbp y usarse en el método de ensayo en el que se incluye peróxido de hidrógeno como reactivo auxiliar, se une cloroperoxidasa a una superficie y se incorpora molibdato en la fase acuosa de un liposoma. También están incluidos como sensibilizadores dentro del alcance de la invención compuestos que no son verdaderos sensibilizadores pero que con excitación mediante calor, luz, radiación ionizante o activación química liberarán una molécula de oxígeno singlete. Los miembros mejor conocidos de esta clase de compuestos incluyen los endoperóxidos tales como endoperóxido de 1,4-biscarboxietil-1,4-naftaleno, 9,10-difenilntracen-9,10-endoperóxido y 5,12-endoperóxido de 5,6,11,12-tetrafenilnaftaleno. El calentamiento o la absorción directa de luz por estos compuestos libera oxígeno singlete.

65 Fotosensibilizador - un sensibilizador para la generación de oxígeno singlete habitualmente mediante excitación con luz. Cuando se excita mediante luz, el fotosensibilizador es habitualmente un compuesto formado por átomos covalentemente unidos, habitualmente con múltiples dobles o triples enlaces conjugados. El compuesto debe

absorber luz en el intervalo de longitud de onda de aproximadamente 200 a aproximadamente 1100 nm, habitualmente, de aproximadamente 300 a aproximadamente 1000 nm, preferiblemente, de aproximadamente 450 a aproximadamente 950 nm, con un coeficiente de extinción a su máximo de absorbancia superior a aproximadamente $1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, preferiblemente, superior a aproximadamente $50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, más preferiblemente, de aproximadamente $100.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a la longitud de onda de excitación. Preferiblemente, el sensibilizador se excita a longitudes de onda distintas, largas de aproximadamente 400 a aproximadamente 1000 nm, más preferiblemente, de aproximadamente 600 a aproximadamente 800 nm.

Los fotosensibilizadores que van a excitarse mediante luz serán relativamente fotoestables y, preferiblemente, no reaccionarán eficazmente con oxígeno singlete. Varias características estructurales están presentes en la mayoría de los fotosensibilizadores útiles. La mayoría de los fotosensibilizadores tienen al menos uno y frecuentemente tres o más dobles o triples enlaces conjugados mantenidos en una estructura rígida, frecuentemente aromática. Contendrán frecuentemente al menos un grupo que acelera el cruce intersistémico tal como un grupo carbonilo o imina o un átomo pesado seleccionado de las filas 3-6 de la tabla periódica, especialmente yodo o bromo, o pueden tener estructuras aromáticas extendidas. Los fotosensibilizadores típicos incluyen acetona, benzofenona, 9-tioxantona, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metaloporfirinas, tales como hematoporfirina, ftalocianinas, naftocianinas, clorofilas, rosa de bengala, buckminsterfulereno, etc., y derivados de estos compuestos que tienen sustituyentes de 1 a 50 átomos para hacer que tales compuestos sean más lipófilos o más hidrófilos y/o como grupos de unión para unirse, por ejemplo, a un miembro sbp. Ejemplos de otros fotosensibilizadores que pueden utilizarse en la presente invención son los que tienen las propiedades anteriores y se enumeran en N. F. Turro, "Molecular Photochemistry" página 132, W. A. Benjamin Inc., N.Y. 1965.

Ejemplos de colorantes sensibilizadores de longitud de onda larga que pueden emplearse en la presente invención son colorantes sensibilizadores de longitud de onda larga útiles para terapia fotodinámica (Woehrie, *et al.*, en Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 1996, 319-327, y Macromol. Symp. 1996, 105, 127-138), metalotexafirinas que absorben a de 730 a 770 nm (Harriman, *et al.*, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1989, 314) y texafirinas (J.L. Sessler y S.J. Wegnorn, 1997, Tetrahedron Organic Chemistry Series vol. 15.

Preferiblemente, los fotosensibilizadores son relativamente no polares para garantizar la disolución en un miembro lipófilo cuando se incorpora el fotosensibilizador en una gotita de aceite, liposoma, partícula de látex, etc.

Reactivo que es reactivo - una molécula, habitualmente un compuesto, que puede activarse mediante un producto producido por un sensibilizador. El reactivo que es reactivo puede ser, por ejemplo, una composición quimioluminiscente, un precursor de indicador fotoactivable, un cromóforo fotoactivable, un fluoróforo fotoactivable y similares.

Composición quimioluminiscente - un agente quimioluminiscente; un compuesto que experimenta un cambio detectable tras la reacción con el producto del sensibilizador. Ejemplos de agentes quimioluminiscentes, a modo de ilustración y no limitación, son olefinas que pueden reaccionar con oxígeno singlete, por ejemplo, para formar hidroperóxidos o dioxetanos, dioxetanos estables que pueden activarse con una base o una enzima, acetilenos que pueden reaccionar con oxígeno singlete para formar dicetones, hidrazonas o hidrazidas que se activan con un peróxido y que pueden formar compuestos azo o carbonilos azo tales como luminol, sustratos de enzimas quimioluminiscentes tales como luciferina, compuestos aromáticos que pueden formar endoperóxidos, etc.

El compuesto quimioluminiscente puede producir cualquier señal detectable tras la reacción con oxígeno singlete. La señal se iniciará habitualmente mediante y/o se detectará como radiación electromagnética y será preferiblemente luminiscencia tal como quimioluminiscencia, fluorescencia, electroluminiscencia o fosforescencia.

Las olefinas que pueden reaccionar con oxígeno singlete -- una reacción típica de olefinas con oxígeno singlete es la adición $2 + 2$ para formar un dioxetano. Las olefinas adecuadas habitualmente no tienen ningún grupo C-H saturado unido a un carbono olefínico excepto carbonos de cabeza de puente no reactivos y tendrán preferiblemente uno o más grupos electrodonadores unidos directamente al carbono olefínico o en conjugación con la olefina. Los dioxetanos pueden disociarse espontáneamente o mediante calentamiento con quimioluminiscencia espontánea, o los grupos carbonilo que se forman pueden formarse como parte de un grupo fluorescente o pueden experimentar reacciones posteriores que conducen a una molécula fluorescente. Alternativamente, esta reacción de disociación puede conducir a la separación de un grupo extintor a partir de un grupo fundamentalmente fluorescente que recupera así su propiedad fluorescente.

Otro tipo de reacción de oxígeno singlete con olefinas es la cicloadición $4 + 2$ con dienos, habitualmente compuestos aromáticos tales como naftalenos, antracenos, oxazoles, furanos, indoles y similares. Una reacción de este tipo conduce inicialmente a un endoperóxido. En algunos casos pueden reorganizarse endoperóxidos para activar ésteres o anhídridos que pueden reaccionar con un grupo adecuadamente colocado para proporcionar una lactona o lactama que puede ser fluorescente. Alternativamente, los endoperóxidos pueden oxidar un precursor del compuesto fluorescente o quimioluminiscente. Los endoperóxidos también pueden disociarse espontáneamente o al calentarse con emisión quimioluminiscente u oxidar un leucocolorante fluorescente.

Todavía otro tipo de reacción de oxígeno singlete con olefinas es la reacción “eno” que produce un alilhidroperóxido. Las olefinas adecuadas tienen un C-H saturado reactivo unido a un carbono olefínico. Este producto puede reaccionar con un éster activo en la misma molécula para formar una dioxetanona que puede disociarse espontáneamente o mediante calor con emisión quimioluminiscente.

En general, las olefinas de interés son las que experimentan una reacción química tras la reacción con oxígeno singlete para formar un producto de reacción metaestable, habitualmente un dioxetano o endoperóxido, que puede descomponerse con emisión simultánea o posterior de luz, habitualmente dentro del intervalo de longitud de onda de 250 a 1200 nm. Se prefieren olefinas ricas en electrones que contienen habitualmente grupos electrodonadores. A modo de ejemplo, tales olefinas ricas en electrones son enol éteres, enaminas, 9-alkiliden-N-alkilacridanos, arilviniléteres, 1,4-dioxenos, 1,4-tioxenos, 1,4-oxazinas, arilimidazoles, 9-alkiliden-xantanos y lucigenina.

La luminiscencia producida tras la reacción de las olefinas de interés con oxígeno singlete será preferiblemente a longitudes de onda por encima de 300 nanómetros, preferiblemente por encima de 500 nanómetros y más preferiblemente por encima de 550 nm. Los compuestos que absorben luz a longitudes de onda más allá de la región en la que los componentes de la muestra contribuyen significativamente a la absorción de luz serán de uso particular en la presente invención. La absorbancia del suero decae rápidamente por encima de 500 nm y se vuelve insignificante por encima de 600 nm. La luminiscencia por encima de 550 nm es de interés particular. Sin embargo, la luminiscencia a longitudes de onda más corta es útil cuando está ausente absorbancia de interferencia de la muestra. Preferiblemente, las olefinas quimioluminiscentes absorberán luz a menos de aproximadamente 400 nm para permitir una manipulación conveniente en luz ambiente sin el riesgo de producir involuntariamente oxígeno singlete mediante fotosensibilización.

Ejemplos de olefinas quimioluminiscentes ricas en electrones adecuadas se exponen en la patente estadounidense n.º 5.709.994. Tales olefinas generalmente tienen un grupo electrodonador en conjugación con la olefina.

Los dioxetanos pueden ser luminiscentes solos o en conjunción con un aceptor de energía fluorescente. Los enol éteres son ejemplos de tales olefinas. Frecuentemente, los compuestos de enol éter tendrán al menos un grupo arilo unido a los carbonos olefínicos en los que el anillo de arilo está sustituido con un grupo electrodonador en una posición que aumenta la reactividad de la olefina con respecto al oxígeno singlete y/o confiere fluorescencia al producto de disociación del dioxetano resultante. El grupo electrodonador puede ser, por ejemplo, hidroxilo, alcoxilo, amino disustituido, alquiltio, furilo, pirilo, etc. Preferiblemente, los enol éteres tienen un grupo electrodonador unido directamente a un carbono olefínico.

Las enaminas son otro ejemplo de tales olefinas. En general, las enaminas útiles se registrarán por las normas expuestas anteriormente para los enol éteres.

Otra familia de agentes quimioluminiscentes es la de los 2,4,5-trifenilimidazoles, con iofina como nombre común para el producto original. Los análogos quimioluminiscente incluyen sustituyentes de para-dimetilamino y metoxilo.

Otras olefinas quimioluminiscentes que satisfacen los requisitos facilitados anteriormente pueden encontrarse en la solicitud de patente europea n.º 0.345.776.

Precursor de indicador fotoactivo - una molécula, habitualmente un compuesto, que reacciona con oxígeno singlete para formar indicadores fotoactivos o para formar un compuesto que puede reaccionar con un compuesto auxiliar que se convierte acto seguido en un indicador fotoactivo. Existen diversos tipos de reacciones de oxígeno singlete que pueden proporcionar compuestos que conducirán a un compuesto indicador fotoactivo. El tipo de reacción que se emplea y la elección del indicador fotoactivo que se desea proporcionar una guía para las estructuras de los precursores de indicadores fotoactivos y cualquier compuesto auxiliar usado en la presente invención.

El precursor de indicador fotoactivo experimenta preferiblemente una reacción con oxígeno singlete que es muy rápida, habitualmente al menos de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^6 s⁻¹, preferiblemente al menos de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 s⁻¹, más preferiblemente, superior a aproximadamente 10^9 s⁻¹. Cuando el producto inicial de la reacción es un producto intermedio que reacciona para dar el precursor fotoactivo, el producto intermedio tiene preferiblemente un tiempo de vida que es corto en relación con el tiempo deseado entre la formación del oxígeno singlete y la detección de la fluorescencia emitida del indicador fotoactivo tras la exposición a la luz. Para la generación del oxígeno singlete y la detección de la fluorescencia simultáneas, el tiempo de vida es habitualmente de aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10 s, preferiblemente, de aproximadamente 10^{-3} . Cuando la generación de oxígeno singlete y la detección de la fluorescencia son secuenciales, el tiempo vida puede variar desde aproximadamente 10^{-3} hasta aproximadamente 30 minutos o más, preferiblemente de menos de aproximadamente de 1 s a aproximadamente 60 s.

Se logran velocidades de reacción superiores de oxígeno singlete proporcionando grupos reactivos con oxígeno singlete en el precursor de indicador fotoactivo que son ricos en electrones. Estos grupos son habitualmente una olefina o acetileno, derivados de hidrazina e hidroxilamina, seleniuros y telururos pero no se limitan a estos grupos. Por ejemplo, se han encontrado telururos que van a ser particularmente útiles porque reaccionan rápidamente con

oxígeno singlete para producir una olefina. La velocidad de reacción depende de la disponibilidad de electrones (oxidación potencial) del telurio. Por ejemplo, los grupos electrodonadores en un sustituyente de anillo de arilo en el átomo de telurio pueden aumentar la velocidad. Cambiando desde telurio hasta selenio (el siguiente calcógeno inferior) se reduce la velocidad, pero aumenta la estabilidad a la oxidación de la molécula.

5 Cuando el precursor de indicador fotoactivo contiene una hidrazina o hidrazida, la reacción con oxígeno singlete puede producir un doble enlace. Por ejemplo, el oxígeno singlete puede convertir hidrazidas directamente en indicadores fotoactivos fluorescentes.

10 La oxidación potencial de una hidrazina es un importante factor para proporcionar una alta velocidad de reacción. Grupos electroattractores tales como un grupo acilo (por ejemplo, como en una hidrazida) ralentizan la reacción aunque las hidrazidas de acilo y las hidrazidas de diacilo todavía pueden usarse como precursores de indicadores fotoactivos en la presente invención. Cuando la reacción no es lo suficientemente rápida, puede a menudo acelerarse en presencia de una base. Por ejemplo, la hidrazida de 3-aminoftaloílo forma un anión en presencia de
15 una base fuerte que es rica en electrones y puede reaccionarse rápidamente con oxígeno singlete para formar 3-aminoftalato como indicador fotoactivo. Sin embargo, el ión hidroxilo no puede usarse como base cuando las partículas que pueden suspenderse contienen el precursor de indicador fotoactivo dentro de una matriz hidrófoba. Pueden usarse partículas hidrófilas tales como agarosa en su lugar para permitir acceso al ión hidroxilo. Habitualmente, el precursor de indicador fotoactivo se unirá covalentemente a la partícula que puede suspenderse
20 cuando la partícula es hidrófila. Todavía otro ejemplo de una reacción de oxígeno singlete útil es la reacción con olefinas ricas en electrones tales como las descritas en la solicitud de patente publicada europea n.º 0 515 194. Se describen dos tipos fundamentales de reacciones. Una de ellas es la reacción "eno", que desplaza la posición de un doble enlace y produce un hidroperóxido. El desplazamiento del doble enlace puede provocar dos grupos auxocrómicos en el precursor de indicador fotoactivo para entrar en conjugación y producir así un indicador fotoactivo fluorescente.

Otros precursores de indicadores fotoactivos reaccionan con oxígeno singlete para formar hidroperóxidos, que pueden reaccionar internamente con un grupo que puede oxidarse para dar un indicador fotoactivo fluorescente. Alternativamente, un hidroperóxido formado mediante la reacción de oxígeno singlete con un precursor de indicador
30 fotoactivo, tal como 1,3-difenilpropeno, puede servir para oxidar la forma leuco de un colorante que está presente como un compuesto auxiliar de modo que se forma un indicador fotoactivo fluorescente. El hidroperóxido también puede oxigenar un elemento del grupo V en un compuesto auxiliar para provocar que actúe como extintor electrodonador de un grupo fluorescente asociado. El compuesto auxiliar podría tener alternativamente un átomo de selenio o telurio que podría reaccionar con un hidroperóxido para producir un producto intermedio que podría
35 experimentar eliminación posterior para formar un indicador fotoactivo fluorescente.

Alternativamente, el precursor de indicador fotoactivo reaccionará lentamente o no reaccionará en absoluto con oxígeno singlete pero reaccionará con un producto de reacción de hidroperóxido de oxígeno singlete y una molécula auxiliar. Por ejemplo, en la siguiente reacción, el compuesto auxiliar se hace reaccionar con oxígeno singlete para
40 formar un hidroperóxido, que entonces se hace reaccionar con un precursor de indicador fotoactivo para formar un indicador fotoactivo fluorescente.

En cada uno de estos ejemplos, el compuesto auxiliar y el precursor de indicador fotoactivo pueden unirse covalentemente. En una aparición de este tipo, la molécula resultante se denomina precursor de indicador fotoactivo.

45 La estructura del precursor de indicador fotoactivo depende por tanto de la reacción de oxígeno singlete particular que va a emplearse y se diseñará habitualmente para garantizar que cualquier reacción posterior iniciada mediante reacción con oxígeno singlete que se requiera para producir un indicador fotoactivo se realizará de manera relativamente rápida. Adicionalmente, la estructura del precursor de indicador fotoactivo conducirá a la formación de
50 un indicador fotoactivo que tiene las longitudes de onda de emisión y absorción deseadas, y tiene rendimientos cuánticos fluorescentes relativamente altos, preferiblemente superiores a 0,1, más preferiblemente superiores a 0,4, y un alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación deseada, preferiblemente superior a $1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, más preferiblemente superior a $10.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

55 Otras clases de precursores de indicadores fotoactivos también pueden usarse en la presente invención. Por ejemplo, compuestos que quimioluminescen en la reacción con oxígeno singlete se convierten frecuentemente en productos fluorescentes que pueden servir como indicadores fotoactivos de la presente invención.

60 "Indicador fotoactivo" se refiere a una molécula que, tras la absorción de luz de longitudes de onda de 250 a 1100 nm, preferiblemente de 300 a 950 nm, emite luz mediante fluorescencia o fosforescencia, preferiblemente mediante fluorescencia, o transfiere su energía de excitación a una molécula aceptora que acto seguido emite luz mediante fluorescencia o fosforescencia. Preferiblemente, el rendimiento cuántico de emisión será alto, habitualmente de al menos 0,1, preferiblemente de al menos 0,4, más preferiblemente superior a 0,7 y el coeficiente de extinción del máximo de absorción será habitualmente superior a $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los indicadores fotoactivos son normalmente
65 compuestos fluorescentes, tales como abrillantadores fluorescentes, que normalmente absorben luz entre 300 y 400 nanómetros y emiten entre 400 y 500 nanómetros; xantenos tales como rodamina y fluoresceína; cumarinas tales

como umbeliferona; aminas aromáticas tales como dansilo; colorantes de escuarato; benzofuranos; cianinas, merocianinas, quelatos de tierras raras y similares. Los indicadores fotoactivos que son fosforescentes incluyen porfirinas, ftalocianinas, compuestos poliaromáticos tales como pireno, antraceno y acenafteno. Los indicadores fotoactivos también incluyen cromenos. Los indicadores fotoactivos que pueden transferir energía a una molécula aceptora absorberán habitualmente a de 250 a 550 nm. Tales moléculasceptoras son luminiscentes y pueden incluir cualquiera de los indicadores fotoactivos fluorescentes y fosforescentes mencionados anteriormente.

Una discusión más detallada de precursores de indicadores fotoactivos e indicadores fotoactivos se expone en la patente estadounidense n.º 5.807.675 (Davalian, *et al.*).

Aceptor de energía fluorescente - un compuesto quimioluminiscente puede tener un aceptor de energía fluorescente en las proximidades del mismo. Normalmente, el aceptor de energía fluorescente es un cromóforo que tiene una absorción substancial superior a 310 nm, normalmente superior a 350 nm, y preferiblemente superior a aproximadamente 400 nm. El ancho de la banda de emisión a la mitad de la altura de pico será habitualmente de menos de 100 nm, preferiblemente menos de 50 nm, más preferiblemente, menos de 25 nm. La elección del aceptor de energía fluorescente estará regida principalmente por el agente quimioluminiscente particular y la vida y longitud de onda de emisión deseadas. El aceptor de energía fluorescente debe poder absorber la luz emitida por el agente quimioluminiscente. Preferiblemente, el máximo de absorción del aceptor de energía fluorescente debe ser a una longitud de onda similar a la emisión máxima del agente quimioluminiscente. Se desea un alto coeficiente de extinción, habitualmente superior a 10, preferiblemente superior a 10^3 , y particularmente preferido superior a 10^4 . El aceptor de energía fluorescente preferiblemente tiene un alto rendimiento cuántico de fluorescencia, habitualmente de al menos 0,1, preferiblemente superior a 0,4.

Los aceptores de energía fluorescente preferidos son de longitud de onda larga, preferiblemente emisores hidrófobos, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos tales como antracenos, por ejemplo, bisfeniletinilantraceno; cumarinas; naftacenos; ftalocianinas; escuarainas, bis-(4-dimetilaminofenil)escuaraina; porfirinas; poliacetilenos, colorantes de oxazina; quelatos de tierras raras, especialmente, Eu, Tb y Sm, y similares. En general estos colorantes actúan como aceptores en procedimientos de transferencia de energía y preferiblemente tienen altos rendimientos cuánticos de fluorescencia y no se reaccionan rápidamente con oxígeno singlete. Pueden incorporarse en matrices junto con el agente quimioluminiscente. También pueden usarse colorantes fluorescentes hidrófilos, particularmente colorantes de cianina, xantenos tales como fluoresceína y rojo Texas y umbeliferonas.

Se describen varias moléculas diferentes útiles como el aceptor de energía fluorescente por Ullman, *et al.* en las patentes estadounidenses n.ºs 4.261.968, 4.174.384, 4.199.559 y 3.996.345, en las columnas 8 y 9.

El aceptor de energía fluorescente puede formarse como resultado de un compuesto que reacciona con oxígeno singlete para formar un compuesto fluorescente o un compuesto que puede reaccionar con un compuesto auxiliar que se convierte inmediatamente en un compuesto fluorescente. El aceptor de energía fluorescente puede incorporarse como parte de un compuesto que también incluye el agente quimioluminiscente. Por ejemplo, el aceptor de energía fluorescente puede incluir un quelato metálico de un metal de tierra rara tal como, por ejemplo, europio, samario, telurio y similares. Estos materiales son particularmente atractivos debido a su banda marcada de luminiscencia.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "asociado con" incluye asociación a través de unión covalente o no covalente o a través de incorporación en, tal como incorporación en una matriz.

Matriz -- un soporte compuesto por un material orgánico o inorgánico, líquido o sólido, insoluble en agua, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El requisito principal de la matriz que tiene un reactivo que es reactivo incorporado en la misma es que permite la difusión de oxígeno singlete en la misma al menos en la ubicación próxima del reactivo que es reactivo incorporado. La matriz puede tener cualquiera de varias formas, tales como partícula, incluyendo perla, película, membrana, tubo, pocillo, tira, barra y similares. La superficie de la matriz es, preferiblemente, hidrófila o que puede volverse hidrófila. El cuerpo de la matriz es, preferiblemente, hidrófobo. La matriz puede suspenderse en el medio en el que se emplea. Ejemplos de matrices que pueden suspenderse según la presente invención, a modo de ilustración y no limitación, son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas, gotitas de aceite, células e hidrogeles. Otras composiciones de matriz incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, poli(butirato de vinilo), etc.; o bien se usados por sí mismos o bien junto con otros materiales.

La unión de los miembros sbp en la matriz puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y puede lograrse mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Immobilized Enzymes," Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978) y Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970).

La superficie de la matriz será habitualmente polifuncional o podrá polifuncionalizarse o podrá unirse a un miembro sbp, o similar, a través de interacciones covalentes o no covalentes específicas o no específicas. Tal unión es

- indirecta cuando se usan las interacciones no covalentes y es directa cuando se emplean las interacciones covalentes. Una amplia variedad de grupos funcionales están disponibles o pueden incorporarse. Los grupos funcionales incluyen ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etileno, grupos hidroxilo, grupos mercapto y similares. La manera de unir una amplia variedad de compuestos a las superficies se conoce bien y se ilustra ampliamente en la bibliografía (véase anteriormente). La longitud de un grupo de unión en el oligonucleótido o miembro sbp puede variar ampliamente, dependiendo de la naturaleza del compuesto que está uniéndose, el efecto de la distancia entre el compuesto que se está uniéndose y la superficie sobre las propiedades de unión específica y similares.
- El reactivo que es reactivo puede incorporarse en la matriz o bien durante o bien tras la preparación de la matriz. El reactivo que es reactivo se elige habitualmente para disolverse en la matriz pero puede unirse covalentemente a la matriz. Los reactivos que son reactivos, cuando no se unen covalentemente, son habitualmente hidrófobos para reducir su capacidad de disociarse de la matriz. En general se elige la composición de matriz de modo que se favorezca la asociación del reactivo que es reactivo con la matriz.
- La cantidad de reactivo que es reactivo asociado con o incorporado en la matriz en la composiciones de la invención depende de varios factores tales como la naturaleza del reactivo que es reactivo, por ejemplo, agente quimioluminiscente, aceptor de energía fluorescente, precursor de indicador fotoactivo, etc., y la matriz y el uso pretendido del reactivo resultante. El reactivo que es reactivo está presente en la matriz en una cantidad necesaria para maximizar la señal producida según la invención, es decir, proporcionar la mayor señal frente al fondo en un ensayo. Generalmente, la cantidad de reactivo que es reactivo se determina empíricamente y es habitualmente aproximadamente de desde 10^{-8} hasta 1 M, preferiblemente, desde 10^{-5} hasta 10^{-2} M, más preferiblemente, de 10^{-3} a 10^{-1} M.
- En general, un miembro sbp está presente en desde aproximadamente el 0,5 hasta aproximadamente el 100, más habitualmente desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 90, frecuentemente desde aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 80 y preferiblemente desde aproximadamente el 50 hasta aproximadamente el 100 por ciento en moles de las moléculas presentes en la superficie de la matriz. La cantidad particular de miembro sbp también depende de varios factores y habitualmente se determina mejor empíricamente.
- Partículas – las partículas de al menos aproximadamente 20 nm y no más de aproximadamente 20 micras, habitualmente de al menos aproximadamente 40 nm y menos de aproximadamente 10 micras, preferiblemente de desde aproximadamente 0,10 hasta 2,0 micras de diámetro, normalmente que tienen un volumen de menos de 1 picolitro. La partícula puede tener cualquier densidad, pero preferiblemente de un densidad que se aproxima a la del agua, generalmente de desde aproximadamente 0,7 hasta aproximadamente 1,5 g/ml. Las partículas pueden o no tener una carga, y cuando están cargadas, son preferiblemente negativas. Las partículas pueden ser sólidas (por ejemplo, compuestas por látex o polímeros orgánicos e inorgánicos), gotitas de aceite (por ejemplo, hidrocarburo, fluorocarburo, fluido de silicona), o vesículas (por ejemplo, sintéticas tales como fosfolípidos o naturales tales como células y orgánulos).
- Las partículas sólidas son normalmente polímeros, o bien polímeros de adición o bien de condensación, que pueden dispersarse fácilmente en el medio de ensayo. Las partículas sólidas también se adsorberán o podrán funcionalizarse de modo que unan o ligen a su superficie, o bien directa o bien indirectamente, un miembro sbp y se incorpore dentro de su volumen un reactivo que es reactivo.
- Las partículas sólidas pueden estar compuestas por poliestireno, poliacrilamida, homopolímeros y copolímeros de derivados de acrilato y metacrilato, particularmente ésteres y amidas, siliconas y similares. Las partículas pueden unirse o ligarse a un miembro sbp tal como se describió anteriormente.
- Gotitas de aceite -- son partículas de fluido inmiscibles en agua compuestas por un compuesto lipófilo recubierto y estabilizado con un emulsionante que es una molécula anfifila tal como, por ejemplo, fosfolípidos, esfingomielina, albúmina y similares que existen como una suspensión en una disolución acuosa, es decir una emulsión. Las emulsiones que comprende gotitas de aceite pueden prepararse según procedimientos convencionales combinando los compuestos lipófilos apropiados con un tensioactivo, aniónico, catiónico o no iónico, en los que el tensioactivo está presente en desde aproximadamente el 0,1 hasta el 5, más habitualmente desde aproximadamente el 0,1 hasta el 2 por ciento en peso de la mezcla y sometiendo la mezcla en un medio acuoso para la agitación, tal como sonicación o agitación con vórtex. Los compuestos lipófilos ilustrativos incluyen aceites de hidrocarburo, halocarburos incluyendo fluorocarburos, ftalatos de alquilo, fosfatos de trialquilo, triglicéridos, etc.
- Los miembros sbp, y cuando sea apropiado el reactivo que es reactivo y reactivos sensibilizadores, pueden unirse a las gotitas de varias maneras. Tal como se describe en Giaever, citado anteriormente, el miembro sbp particular, por ejemplo, un miembro sbp proteico, puede recubrirse sobre las gotitas introduciendo un exceso del miembro sbp en el medio acuoso antes o después de la etapa de emulsionamiento. Son deseables etapas de lavado para eliminar el miembro sbp en exceso. La funcionalización del aceite introduce funcionalidades descritas anteriormente para unirse a los miembros sbp.

Un reactivo sensibilizador o un reactivo que es reactivo puede elegirse que sea soluble en la fase aceitosa de la gotita de aceite. Cuando el aceite es un fluorocarburo, un reactivo sensibilizador fluorado o un reactivo que es reactivo es a menudo más soluble que la derivación no fluorada correspondiente.

5 Liposomas -- microvesículas compuestas por una o más bicapas lipídicas que tienen forma aproximadamente esférica y uno de los materiales preferidos para su uso en la presente invención. Los liposomas tienen un diámetro que es al menos de aproximadamente 20 nm y no más de aproximadamente 20 micras, habitualmente de al menos aproximadamente 40 nm y menos de aproximadamente 10 micras. Preferiblemente, el diámetro de los liposomas será de menos de aproximadamente dos micras de modo que limite la sedimentación o la flotación.

10 Los fosfolípidos empleados en la preparación de partículas que pueden utilizarse en la presente invención pueden ser cualquier fosfolípido o mezcla de fosfolípidos que se encuentra en membranas naturales incluyendo lecitina, o diésteres de fosfato de glicerilo sintéticos de ácidos grasos lineales de 12 carbonos o 24 carbonos saturados o insaturados en los que el fosfato puede estar presente como un monoéster, o como un éster de un alcohol polar tal como etanolamina, colina, inositol, serina, glicerol y similares. Particularmente, los fosfolípidos preferidos incluyen L- α -patmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoil-oleoilfosfatidil-glicerol (POPG), L- α -dioleoilfosfatidilglicerol, L- α (dioleoil)-fosfatidil-etanolamina (DOPE) y L- α -(dioleoil)-fosfatidil-(4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxiamido)etanol (DOPE-MCC).

20 Para su uso en la presente invención los liposomas deben poder unirse a un miembro sbp y poder tener un reactivo sensibilizador o reactivo que es reactivo asociado con o bien la fase acuosa o bien la fase no acuosa.

25 Los liposomas pueden producirse mediante una variedad de métodos incluyendo hidratación y dispersión mecánica de fosfolípido o sustituto de fosfolípido secado en una disolución acuosa. Los liposomas preparados de esta manera tienen una variedad de dimensiones, composiciones y comportamientos. Un método de reducción de la heterogeneidad y discrepancia de comportamiento de liposomas mecánicamente dispersos es mediante sonicación. Un método de este tipo reduce el tamaño de liposoma promedio. Alternativamente, puede usarse extrusión como una etapa final durante la producción de los liposomas. La patente estadounidense 4.529.561 da a conocer un método de extrusión de liposomas bajo presión a través de una membrana de tamaño de poro uniforme para mejorar la uniformidad de tamaño.

35 La preparación de liposomas que contienen un reactivo sensibilizador o un reactivo que es reactivo disuelto en la bicapa lipídica puede llevarse a cabo en una variedad de métodos, incluyendo un método descrito por Olson, *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 557, 1979, 9-23.

40 Partículas de látex -- "Látex" significa un material polimérico particulado insoluble en agua, que puede suspenderse en agua que tiene habitualmente dimensiones de partícula de 20 nm a 20 μ m, más preferiblemente de 100 a 1000 nm de diámetro. El látex es frecuentemente un polietileno sustituido tal como poliestireno-butadieno, poli(acrilamida-poliestireno), poliestireno con grupos amino, ácido poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), acrilonitrilo-butadieno, copolímeros de estireno, poli(acetato-acrilato de vinilo), polivinilpiridina, copolímeros de acrilato-cloruro de vinilo y similares. Se prefieren polímeros no reticulados de estireno y estireno carboxilado o estireno funcionalizado con otros grupos activos tales como amino, hidroxilo, halógeno y similares. Frecuentemente, se usarán los copolímeros de estirenos sustituidos con dienos tales como butadieno.

45 La asociación del reactivo sensibilizador o reactivo que es reactivo con partículas de látex utilizada en la presente invención puede implicar la incorporación durante la formación de las partículas mediante polimerización pero implicará habitualmente la incorporación en partículas formadas previamente, habitualmente mediante disolución no covalente en las partículas. Habitualmente, se empleará una disolución del reactivo.

50 Un miembro sbp o miembro del reactivo marcador puede adsorberse físicamente sobre la superficie de la partícula de látex o puede unirse o ligarse covalentemente a la partícula de manera similar a la tratada anteriormente con respecto a las matrices.

55 Miembro de un par de unión específica ("miembro sbp") -- una de dos moléculas diferentes, que tienen una zona en la superficie o en una cavidad que se une específicamente a y se define de ese modo como complementaria con una organización polar y espacial particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específica se denominan ligando y receptor (anti-ligando). Estos serán habitualmente miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo, aunque otros pares de unión específica tales como biotina-avidina, hormonas-receptores de hormonas, dúplex de ácido nucleico, IgG-proteína A, pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN y similares no son pares inmunológicos pero están incluidos en la invención y la definición del miembro sbp.

65 Polinucleótido - un compuesto o composición que es un nucleótido polimérico que tiene en el estado natural aproximadamente de 50 a 500.000 o más nucleótidos y que tiene en el estado aislado aproximadamente de 15 a 50.000 o más nucleótidos, habitualmente de aproximadamente 15 a 20.000 nucleótidos, más frecuentemente de 15 a 10.000 nucleótidos. El polinucleótido incluye ácidos nucleicos de cualquier fuente en forma purificada o no purificada, que se producen de manera natural o de manera sintética, incluyendo ADN (ADNbc y ADNmc) y ARN,

habitualmente ADN, y puede ser ARN-t, ARN-m, ARN-r, ARN y ADN mitocondrial, ARN y ADN de cloroplasto, híbridos de ADN-ARN, o mezclas de los mismos, genes, cromosomas, plásmidos, los genomas de material biológico tales como microorganismos, por ejemplo, bacterias, levaduras, virus, viroides, mohos, hongos, plantas, animales, seres humanos, y fragmentos de los mismos y similares.

5 Ligando - cualquier compuesto orgánico para el que existe de manera natural un receptor o puede prepararse.

10 Análogo de ligando – un ligando modificado, un radical orgánico o análogo de analito, habitualmente de un peso molecular superior a 100, que puede competir con el análogo de ligando por un receptor, proporcionando la modificación medios para unir un análogo de ligando a otra molécula. El análogo de ligando diferirá habitualmente del ligando en más que la sustitución de un hidrógeno por un enlace que une el análogo de ligando a un centro o un marcador, pero no es necesario. El análogo de ligando puede unirse al receptor de manera similar al ligando. El análogo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra el idiotipo de un anticuerpo contra el ligando.

15 Receptor (“anti-ligando”) - cualquier compuesto o composición que puede reconocer una organización polar y espacial particular de una molécula, por ejemplo, un sitio epitópico o determinante. Los receptores ilustrativos incluyen los receptores que se producen de manera natural, por ejemplo, globulina que se une a tiroxina, anticuerpos, enzimas, fragmentos Fab, lectinas, ácidos nucleicos, proteína A, componente del complemento C1q y similares.

20 Unión específica – el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes para la otra en comparación con el reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Generalmente, las moléculas tienen zonas en sus superficies o en cavidades que dan lugar al reconocimiento específico entre las dos moléculas. Ejemplos de la unión específica son las interacciones anticuerpo-antígeno, interacciones enzima-sustrato, interacciones de polinucleótidos etcétera.

25 Unión no específica – la unión no covalente entre las moléculas que es relativamente independiente de las estructuras de superficie específicas. La unión no específica puede resultar de diversos factores incluyendo interacciones hidrófobas entre moléculas.

30 Anticuerpo - una inmunoglobulina que se une específicamente a y se define de este modo como complementaria con una organización polar y espacial particular de otra molécula. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede prepararse mediante técnicas que se conocen bien en la técnica tales como inmunización de un huésped y recogida de sueros (policlonales) o preparando líneas celulares híbridas continuas y recogiendo la proteína secretada (monoclonal), o clonado y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican al menos para las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmento de la misma, incluyendo las inmunoglobulinas las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab' y similares. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado siempre que se mantenga la afinidad de unión para una molécula particular.

45 Sustituido - significa que un átomo de hidrógeno de una molécula se ha sustituido por otro átomo, que puede ser un único átomo tal como un halógeno, etc., o parte de un grupo de átomos que forman una funcionalidad tal como un sustituyente que tiene desde 1 hasta 50 átomos (distintos de los átomos de hidrógeno requeridos, necesarios para satisfacer las valencias de tales átomos), seleccionándose los átomos independientemente del grupo que consiste en carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre, halógeno (cloro, bromo, yodo, flúor) y fósforo, y que pueden estar unidos o no a uno o más átomos de metal.

50 Grupo electrodonador - un sustituyente que, cuando se une a una molécula, puede polarizar la molécula de modo que el grupo electrodonador se convierta en pobre en electrones y se cargue positivamente con respecto a la otra parte de la molécula, es decir, tiene densidad electrónica reducida. Tales grupos incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, aminas, éteres, tioéteres, fosfinas, hidroxilo, oxianiones, mercaptanos y sus aniones, sulfuros, etc.

55 Un sustituyente que tiene desde 1 hasta 50 átomos (distintos de los átomos de hidrógeno requeridos, necesarios para satisfacer las valencias de tales átomos), seleccionándose los átomos independientemente del grupo que consiste en carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre, halógeno y fósforo -- un radical orgánico; el radical orgánico tiene de 1 a 50 átomos distintos del número requerido de átomos de hidrógeno necesarios para satisfacer las valencias de los átomos en el radical. Generalmente, el átomo predominante es carbono (C) pero también puede ser oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P), en los que el O, N, S, o P, si están presentes, se unen al carbono o uno o más entre sí o al hidrógeno o un átomo de metal para formar diversos grupos funcionales, tales como, por ejemplo, grupos carboxilo (ácidos carboxílicos), grupos hidroxilo (alcoholes), grupos mercapto (tioles), carboxamidas, carbamatos, ésteres de ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ésteres de ácidos sulfónicos, ácidos fosfóricos, ésteres de ácidos fosfóricos, ureas, carbamatos, fosforamidas, sulfonamidas, sulfuros, tioéteres, olefinas, acetilenos, aminas, cetonas, aldehídos y nitrilos, y alquilo, alquilidino, arilo, aralquilo, y alquilo, arilo, y aralquilo sustituidos con uno o más de los grupos funcionales mencionados anteriormente, por ejemplo, fenilo, naftilo,

fenantrilo, m-metoxifenilo, dimetilamino, tritilo, metoxilo, N-morfolino y pueden tomarse en conjunto para formar un anillo tal como, por ejemplo, adamantilo, N-metilacridanilida, xantanilidina, 1-(3,4-benzo-5-hidrofurilideno) y similares.

5 Grupo de unión - un grupo implicado en el enlace covalente entre moléculas. El grupo de unión variará dependiendo de la naturaleza de las moléculas, es decir, el sensibilizador, reactivo que es reactivo, matriz, miembro sbp o molécula asociada con, o parte de, una partícula que está uniéndose. Se emplearán los grupos funcionales que normalmente están presentes o se introducen en una matriz o un miembro sbp para unir estos materiales.

10 Para la mayor parte, las funcionalidades de carbonilo encontrarán uso, tanto oxocarbonilo, por ejemplo, aldehído, como no oxocarbonilo (incluyendo análogos de nitrógeno y azufre) por ejemplo, carboxilo, amidina, amidato, tiocarboxilo y tionocarboxilo.

15 Las funcionalidades alternativas de oxo incluyen halógeno activo, diazo, mercapto, olefina, particularmente olefina activada, amino, fósforo y similares. Puede encontrarse una descripción de grupos de unión en la patente estadounidense n.º 3.817.837.

20 Los grupos de unión pueden variar desde un enlace a una cadena de desde 1 hasta 100 átomos, habitualmente desde aproximadamente 1 hasta 70 átomos, preferiblemente de 1 a 50 átomos más preferiblemente de 1 a 20 átomos, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste normalmente en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno, halógeno y fósforo. El número de heteroátomos en los grupos de unión normalmente oscilará entre aproximadamente 0 y 20, habitualmente entre aproximadamente 1 y 15, más preferiblemente entre 2 y 6. Los átomos en la cadena pueden sustituirse por átomos distintos de hidrógeno de manera similar a la descrita anteriormente para el sustituyente que tiene desde 1 hasta 50 átomos. Como regla general, la longitud de un grupo de unión particular puede seleccionarse arbitrariamente para proporcionar conveniencia de síntesis y la

25 incorporación de cualquier grupo deseado tal como un aceptor de energía, fluoróforo, grupo para análisis de cruce entre sistemas tal como un átomo pesado y similares. Los grupos de unión pueden ser alifáticos o aromáticos, aunque con los grupos diazo, los grupos aromáticos habitualmente estarán implicados.

30 Cuando están presentes heteroátomos, el oxígeno estará presente normalmente como oxo u oxi, unido a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo, el nitrógeno estará presente normalmente como nitro, nitroso o amino, normalmente unido a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el azufre sería análogo al oxígeno; mientras que el fósforo estará unido al carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, habitualmente como fosfonato y mono- o diéster de fosfato.

35 Funcionalidades comunes en la formación de un enlace covalente entre el grupo de unión y la molécula que va a conjugarse son alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter y carboxilato, sulfonato y ésteres de fosfato, amidas y tioésteres.

40 Para la mayor parte, cuando un grupo de unión tendrá un grupo no oxocarbonilo incluyendo análogos de nitrógeno y azufre, un grupo fosfato, un grupo amino, agente alquilante tal como halógeno o tosialquilo, oxi (hidroxilo o el análogo de azufre, mercapto) oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona), o olefina activa tal como un vinilsulfona o éster α -, β -insaturado. Estas funcionalidades se unirán a los grupos amina, grupos carboxilo, olefinas activas, agente alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. Cuando se unen una amina y un ácido carboxílico o su derivado de nitrógeno o ácido fosfórico, se formarán amidas, amidinas y fosforamidas. Cuando se unen mercaptano y olefina activada, se formarán tioéteres. Cuando se unen un mercaptano y un agente alquilante, se formarán tioéteres.

45 Cuando se unen aldehído y una amina en condiciones reductoras, se formará una alquilamina. Cuando se unen un ácido carboxílico o ácido de fosfato y un alcohol, se formarán ésteres.

50 Un grupo o funcionalidad que confiere hidrofiliidad o solubilidad en agua - es una funcionalidad hidrófila, que aumenta la humectabilidad de los sólidos con agua y la solubilidad en agua de compuestos a los que se une. Tal grupo funcional o funcionalidad puede ser un sustituyente que tiene de 1 a 50 o más átomos y puede incluir un grupo que tiene un sulfonato, sulfato, fosfato, amidina, fosfonato, carboxilato, hidroxilo particularmente polioles, amina, éter, amida y similares. Los grupos funcionales ilustrativos son carboxialquilo, sulfonoxialquilo, CONHOCH₂COOH, CO-(glucosamina), azúcares, dextrano, ciclodextrina, SO₂NHCH₂COOH, SO₃H, CONHCH₂CH₂SO₃H, PO₃H₂, OPO₃H₂, hidroxilo, carboxilo, cetona, y combinaciones de los mismos. La mayoría de las funcionalidades anteriores

55 también pueden utilizarse como grupos de unión, que permiten la unión de un miembro sbp o similar a una composición particulada que comprende el marcador.

60 Un grupo o una funcionalidad que confiere lipofiliidad o solubilidad lipídica - es una funcionalidad lipófila, que disminuye la humectabilidad de superficies por el agua y la solubilidad en agua de compuestos a los que se une. Tal grupo funcional o funcionalidad puede contener de 1 a 50 o más átomos, habitualmente átomos de carbono sustituidos con hidrógeno o halógeno y puede incluir alquilo, alquilideno, arilo y aralquilo. La funcionalidad o grupo lipófilo tendrá normalmente de uno a seis grupos alifáticos de cadena lineal o ramificada de al menos 6 átomos de carbono, más habitualmente al menos 10 átomos de carbono, y preferiblemente al menos 12 átomos de carbono, habitualmente no más de 30 átomos de carbono. El grupo alifático puede unirse a anillos de desde 5 hasta 6

65 miembros, que pueden ser alicíclicos, heterocíclicos o aromáticos. Los grupos lipófilos pueden unirse a un marcador u otra sustancia para aumentar su solubilidad en una matriz no acuosa.

Materiales auxiliares - Diversos materiales auxiliares se emplearán frecuentemente en un ensayo según la presente invención. Por ejemplo, normalmente estarán presentes tampones en el medio de ensayo, así como estabilizadores para el medio de ensayo y los componentes de ensayo. Frecuentemente, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; disolventes orgánicos tales como formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos; potenciadores de unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; o similares.

Total o parcialmente de manera secuencial – cuando se combinan la muestra y diversos agentes utilizados en la presente invención de manera distinta a la concomitante (simultánea), uno o más puede(n) combinarse con uno o más de los agentes restantes para formar una subcombinación. Entonces cada subcombinación puede someterse a una o más etapas del presente método. Por tanto, cada una de las subcombinaciones puede incubarse en condiciones para lograr uno o más de los resultados deseados.

Tal como se mencionó anteriormente, el presente método se refiere a la determinación de la presencia o las cantidades relativas de más de dos componentes en un medio. Se proporciona una combinación que comprende un medio que se sospecha que contiene los componentes y al menos dos reactivos sensibilizadores y al menos dos reactivos que son reactivos que pueden reaccionar con el producto del reactivo sensibilizador activado. El reactivo sensibilizador puede generar oxígeno singlete. La interacción de cada uno de los reactivos sensibilizadores con un reactivo que es reactivo se corresponde con, y permite de ese modo la detección de, cada componente respectivo. Los reactivos sensibilizadores se activan diferencialmente y se mide la cantidad de señal para cada interacción particular. La cantidad de señal se refiere a la cantidad de cada uno de los componentes en el medio. Los reactivos que son reactivos pueden asociarse con una matriz que está incorporándose en ese documento o unirse a la misma. Además, los reactivos sensibilizadores pueden asociarse con una matriz incorporándose en la misma o uniéndose a la misma. Un reactivo sensibilizador y un reactivo que es reactivo pueden asociarse con la misma matriz de manera similar a la tratada en la patente estadounidense n.º 5.709.994, citada anteriormente.

El ensayo se lleva a cabo habitualmente en un medio tamponado acuoso a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El medio acuoso puede ser solamente agua o puede incluir desde el 0,01 hasta el 80 por ciento o más en volumen de un codisolvente. El pH para el medio habitualmente estará en el intervalo de aproximadamente 4 a 13, más habitualmente en el intervalo de aproximadamente 5 a 10, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6,5 a 9,5. El pH se selecciona generalmente para lograr especificidad y sensibilidad de ensayo óptimas. Entre los factores que deben considerarse están la dependencia con el pH de las velocidades de las reacciones implicadas, la unión de los miembros de unión y la minimización de la unión no específica, etcétera.

Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital y similares. El tampón particular empleado no es crítico para esta invención, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro tampón.

Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el ensayo y habitualmente temperatura constante, preferiblemente, temperatura ambiente, durante el periodo de la medición. Las temperaturas de incubación normalmente oscilarán entre aproximadamente 5º y 99ºC, habitualmente entre aproximadamente 15º y 70ºC, más habitualmente entre 20 y 45ºC. Las temperaturas durante las mediciones generalmente oscilarán entre aproximadamente 10º y 70ºC, más habitualmente entre aproximadamente 20º y 45ºC, más habitualmente entre 20º y 25ºC.

En algunos ejemplos, un reactivo que es reactivo activado, por ejemplo, un agente quimioluminiscente activado, puede requerir calentamiento hasta 100ºC con el fin de que se descomponga para producir luminiscencia debido a que el producto de su reacción es relativamente estable a temperaturas ambientales. Pueden formarse dioxetanos relativamente estables, por ejemplo, mediante la reacción de oxígeno singlete con adamantilidenos y pueden formarse endoperóxidos relativamente estables mediante la reacción de oxígeno singlete con antracenos y naftalenos 1,4-disustituidos (véase, por ejemplo, N.J. Turro, Modern Molecular Photochemistry (1978) Benjamin Cummings Publishing Co. página 594). En ambas circunstancias anteriores, los materiales estables experimentarán descomposición tras el calentamiento, habitualmente, a una temperatura de menos de 200ºC, preferiblemente de aproximadamente 50 a 100ºC. Tal calentamiento provoca la rápida descomposición del aducto de oxígeno singlete/olefina y, por tanto, la emisión de luz se produce a lo largo de un corto periodo de tiempo. El uso de este enfoque puede desearse cuando las señales separadas de diferentes agentes quimioluminiscentes son difíciles de resolver por completo mediante la vida y la longitud de onda.

La concentración de componentes que va a detectarse generalmente variará desde aproximadamente 10^{-5} hasta 10^{-17} M, más habitualmente desde aproximadamente 10^{-6} hasta 10^{-14} M. Las consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo, la técnica de detección particular y la naturaleza y la concentración de los componentes de interés normalmente determinarán las concentraciones de los diversos reactivos.

Aunque las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente se determinarán mediante el intervalo de concentración de interés de los componentes que van a detectarse, la concentración final

de cada uno de los reactivos normalmente se determinará empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo a lo largo del intervalo. Es decir, una variación en concentración de los componentes que van a detectarse que es de significación debe proporcionar una diferencia de señal que puede medirse de manera precisa.

5 Tal como se mencionó anteriormente, uno o ambos los reactivos sensibilizadores y reactivos que son reactivos pueden comprender una matriz, preferiblemente en forma de partículas, con las que el sensibilizador o reactivo que es reactivo es, o el sensibilizador y el reactivo que es reactivo están asociados. En esta realización, la matriz tiene el sensibilizador o reactivo que es reactivo o ambos incorporados en la misma y/o unidos a su superficie. La cantidad del sensibilizador o reactivo que es reactivo asociado con la matriz es habitualmente de aproximadamente el 20% del peso de la matriz, más habitualmente de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 20% del peso de la matriz. Cuando se emplean uno o más aceptores de energía fluorescente junto con el reactivo que es reactivo, el aceptor de energía fluorescente es habitualmente aproximadamente de 10^{-7} a aproximadamente 10^{-1} M, preferiblemente de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-2} M.

15 Aunque el orden de adición puede variarse ampliamente, existirán determinadas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden de adición más sencillo es añadir los materiales simultáneamente. Alternativamente, los reactivos pueden combinarse total o parcialmente de manera secuencial. Una o más etapas de incubación pueden estar implicadas después de que se combinen los reactivos, generalmente que oscilan entre aproximadamente 5 segundos y aproximadamente 24 horas, habitualmente, entre 30 segundos y 6 horas, más habitualmente entre 20 aproximadamente 2 minutos y 1 hora.

El control principal de la activación diferencial en el presente método se refiere a la naturaleza del sensibilizador. Los sensibilizadores activados por luz generalmente se eligen basándose en la longitud de onda de activación. Las características estructurales que contribuyen a la diferente longitud de onda de activación incluyen grupos electrodonadores y/o electroattractores, el grado de conjugación dentro de la molécula, la planaridad de la molécula, deformación de enlace, ligandos de metal, presencia de heteroátomos en la molécula, etcétera. Otras características que contribuyen a la diferente longitud de onda de activación incluyen pH, polaridad de disolvente, complejos moleculares y transferencia de energía desde, por ejemplo, un fluoróforo. Cuando se usa el mecanismo de transferencia de energía, puede elegirse el mismo componente sensibilizador junto con diversos fluoróforos para la modulación de la longitud de onda de iluminación para la fotoactivación. Esto permitirá aumentar la multiplexación. La eficiencia de la generación de oxígeno singlete también es un factor en la elección de un sensibilizador.

Para los sensibilizadores activados por luz, se irradia el medio con luz para activar el sensibilizador. La irradiación generalmente se lleva a cabo por medio de una lámpara incandescente tal como halógena de cuarzo o halógena de mercurio, diodos emisores de luz, láseres de estado sólido y gas. Se trataron anteriormente las longitudes de onda de activación.

Se eligen los sensibilizadores quimioactivados basándose en el tiempo de activación, que a su vez se refiere al tipo de activación. Los sensibilizadores quimioactivados incluyen compuestos que tienen un enlace químicamente lábil a un resto, lo que impide que el compuesto realice su función como sensibilizador. Un enlace lábil de este tipo puede ser un resto tal como, por ejemplo, un éster, amida, acetal y similares. El compuesto se quimioactiva mediante el tratamiento con un producto químico tal como, por ejemplo, un ácido o una base, que destruye el enlace lábil y hace que el compuesto pueda prepararse como un sensibilizador en la presente invención. Para los sensibilizadores quimioactivados, el medio se trata generalmente con el reactivo químico apropiado para activar el sensibilizador. Habitualmente, esto implica añadir el reactivo químico al medio.

La activación enzimática de una molécula también está incluida dentro del alcance de la presente invención. La eliminación de un grupo mediante una enzima puede activar un compuesto para convertirse en un fotosensibilizador. Los grupos de enmascaramiento/protección fotolábiles también pueden ser útiles. El uso de múltiples grupos fotolábiles junto con un único grupo sensibilizador aumenta la capacidad de multiplexación.

Tal como se mencionó anteriormente, los diferentes sensibilizadores pueden usarse junto con diferentes reactivos que son reactivos para lograr multiplexación adicional. Los compuestos quimioluminiscentes se diferencian basándose en la longitud de onda de emisión y/o velocidad de descomposición. Otro factor que permite el control del tiempo hasta la luminiscencia es la composición de la matriz tal como la partícula. En general, cuando la matriz está compuesta por un material no polar en el que se disuelve el agente quimioluminiscente, se aumentan los tiempos de descomposición en relación a los materiales polares. Otro factor que puede usarse para controlar la velocidad de luminiscencia es la temperatura. En general, aumentando la temperatura disminuirá el tiempo de descomposición.

La naturaleza del compuesto generador de señales, el agente quimioluminiscente determina la manera de medir la señal. La luz producida en el método puede medirse de manera visual, fotográfica, actinométrica, espectrofotométrica o mediante cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad de la misma, que está relacionada con la cantidad de cada componente en el medio. La luz emitida puede medirse aunque el reactivo productor de señales esté en contacto con el medio de ensayo, por ejemplo, por medio de un luminómetro o un material fotosensible.

Una aplicación particular de los métodos de la invención es un método para determinar la presencia o las cantidades relativas de más de dos analitos, siendo cada uno de ellos un miembro de un par de unión específica (sbp). Se proporciona una combinación que comprende un medio que se sospecha que contiene más de dos analitos, una pluralidad de fotosensibilizadores y múltiples reactivos que son reactivos. El número de combinaciones de fotosensibilizadores y reactivos que son reactivos son suficientes para diferenciar cada uno de los analitos en el medio. Por ejemplo, puede usarse un fotosensibilizador diferente para cada analito junto con múltiples agentes quimioluminiscentes. Por otro lado, el número de fotosensibilizadores puede ser menor que el número total de analitos que van a diferenciarse. En este caso, pueden usarse múltiples agentes quimioluminiscentes en los que estos agentes pueden distinguirse mediante longitud de onda de emisión y/o velocidad de descomposición. Cada reactivo fotosensibilizador comprende un primer miembro sbp unido a una partícula con la que el fotosensibilizador está asociado. Cada primer miembro sbp puede unirse al analito o a un segundo miembro sbp para formar un complejo relacionado con la cantidad del analito respectivo. La combinación se incuba en un medio en condiciones suficientes para permitir que los miembros sbp se unan a los analitos o a los segundos miembros sbp respectivos. El medio se irradia diferencialmente con luz. Se detecta la cantidad de emisión luminiscente generada por cada uno de los reactivos que son reactivos en un tiempo tras la irradiación correspondiente a la irradiación de un fotosensibilizador particular. Puesto que se emplean múltiples reactivos que son reactivos, también se proporciona la consideración respecto a la longitud de onda de emisión y el tiempo de emisión a partir de los reactivos que son reactivos respectivos. Entonces se relaciona la cantidad de cada emisión luminiscente medida con la cantidad de cada analito en el medio.

En una realización alternativa en un método para determinar la presencia o las cantidades relativas de más de dos analitos, siendo cada uno de ellos un miembro de un par de unión específica (sbp), se proporciona una combinación que comprende un medio que se sospecha que contiene una pluralidad de analitos, una pluralidad de fotosensibilizadores y múltiples reactivos que son reactivos. Tal como se mencionó anteriormente, el número de combinaciones de fotosensibilizadores y reactivos que son reactivos son suficientes para diferenciar cada uno de los analitos en el medio. Cada reactivo comprende un primer miembro sbp unido a una partícula con la que el fotosensibilizador y el reactivo que es reactivo están asociados. Cada miembro sbp puede unirse al analito o a un segundo miembro sbp para formar un complejo relacionado con la cantidad del analito respectivo. Se incuba la combinación en un medio en condiciones suficientes para permitir que los miembros sbp se unan a los analitos o a los segundos miembros sbp respectivos. Se separan los reactivos no unidos de los reactivos que están unidos a los analitos respectivos. Esto puede realizarse mediante técnicas convencionales tales como el uso de un soporte al que se une un reactivo de unión, que se une a todos los analitos en el medio que se unen mediante reactivos de partícula respectivos. Tras la separación de los reactivos no unidos del soporte tal como mediante lavado, los reactivos unidos se irradian diferencialmente con luz. Se detecta la cantidad de emisión luminiscente generada por cada uno de los reactivos que son reactivos a un tiempo tras la irradiación correspondiente a la irradiación de un fotosensibilizador particular. Puesto que se emplean múltiples reactivos que son reactivos, también se proporciona la consideración respecto a la longitud de onda de emisión y el tiempo de emisión de los reactivos que son reactivos respectivos. Entonces se relaciona la cantidad de cada emisión luminiscente medida con la cantidad de cada analito en el medio. En este enfoque, el reactivo sensibilizador combinado con un reactivo que es reactivo en la misma matriz funciona meramente como generador de señales.

El método de la invención puede adaptarse a la mayoría de los ensayos que implican miembros sbp tales como ligando-receptor, por ejemplo, reacciones antígeno-anticuerpo, ensayos de unión de polinucleótidos, etcétera. Los ensayos habitualmente son homogéneos o heterogéneos, preferiblemente homogéneos, incluyendo competitivos e intercalados ("sandwich"). En un ensayo de unión específica, puede pretratarse la muestra, si es necesario, para eliminar los materiales no deseados o para hacer que el analito sea detectable.

Tal como se mencionó anteriormente, el primer miembro sbp anterior puede unirse al analito o a un segundo miembro sbp que puede unirse al analito. Cuando el segundo miembro sbp también puede unirse al analito, puede dar como resultado un protocolo de ensayo intercalado. La reacción inmunológica para un ensayo de tipo intercalado habitualmente implica un miembro sbp, por ejemplo, un anticuerpo, que es complementario al analito, un segundo miembro sbp, por ejemplo, anticuerpo, que también es complementario al analito y unirse a la matriz particulada y la muestra de interés.

Uno de los miembros sbp puede ser alternativamente análogo al analito, en cuyo caso puede dar como resultado un protocolo de ensayo competitivo. La reacción inmunológica para un protocolo competitivo habitualmente implica un miembro sbp que es complementario al analito y un miembro sbp que es análogo a, habitualmente un derivado del analito. Uno de estos miembros sbp se asociará con la matriz.

En un tipo de ensayo, se combinan y se incuban una muestra que se sospecha que contiene un analito, que es un miembro sbp, y los otros reactivos del ensayo. Entonces se irradia el medio a longitudes de onda apropiadas correspondientes al número de fotosensibilizadores empleados. El medio se examina diferencialmente para detectar la presencia de emisión, habitualmente midiendo la cantidad de luz emitida, que está relacionada con la cantidad de cada analito en la muestra. Esto enfoque es un ensayo homogéneo en el que no se emplea una etapa de separación. Alternativamente, puede usarse una matriz particulada o no particulada, que, tras combinar los reactivos del ensayo y incubar, puede separarse de la fase líquida, y entonces puede irradiarse diferencialmente o bien la fase

sólida o bien la fase líquida y examinarse diferencialmente para detectar la presencia de emisión.

Otro ejemplo de un protocolo de ensayo se describe a continuación a modo de ejemplo y no de limitación. Un compuesto quimioluminiscente se asocia con una partícula, que se une a un reactivo de unión específica (por ejemplo: anticuerpo, oligonucleótido, receptor, etc.) que es complementario al analito. Una partícula sensibilizadora se une a un segundo reactivo de unión específica que es complementario al analito. Existe un reactivo de partícula sensibilizadora para cada analito separado. En un formato de ensayo intercalado, el analito lleva tanto la partícula sensibilizadora como la partícula del agente quimioluminiscente en estrecha proximidad. La activación de las partículas sensibilizadoras con luz da como resultado la formación de oxígeno singlete, que se canaliza en el reactivo marcador de partícula. Habitualmente, se activan diferencialmente los reactivos sensibilizadores y se detecta y se mide secuencialmente la luz resultante emitida por cada composición quimioluminiscente.

Mediante la elección acertada de reactivos sensibilizadores con diferentes longitudes de onda de activación o diferentes modos de activación y de reactivos que son reactivos con diferentes vidas y diferente máximos de emisión, los ensayos pueden llevarse a cabo con alta sensibilidad y gran intervalo dinámico. La sensibilidad y precisión de los ensayos pueden optimizarse prestando atención a la preparación de reactivos tal como el recubrimiento de reactivos sobre la superficie de una matriz y similares. Por tanto, pueden realizarse la cuantificación y detección simultáneas de más de dos componentes en una muestra. Tal como se mencionó anteriormente, los reactivos usados en la presente invención pueden activarse mediante oxígeno singlete. Las señales puede deconvolucionarse mediante la diferencia en longitud de onda o modo de activación junto con la diferencia en longitud de onda y/o tiempo de emisión.

Los siguientes ejemplos son sólo con fin ilustrativo.

25 Ejemplos

Las partes y porcentajes enumerados en el presente documento están en peso a menos que se especifique lo contrario. Las temperaturas están en grados centígrados (°C).

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato para capilares Hoover y no se corrigen. Los espectros de ¹H-RMN se registraron en un espectrómetro de RMN Bruker WP-250 MHz o Bruker WP-300 MHz. Los desplazamientos químicos se notificaron en partes por millón (δ 0,0). Las multiplicidades de RMN se registran mediante el uso de las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete; m, multiplete; Hz, hercio. Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrómetro IR Perkin-Elmer 297. La ionización química por desorción (C.I.) y la ionización electrónica (E.I.) se realizaron en un espectrómetro de masas de alta resolución de doble enfoque, Varian-MAT 311A. Se usó un aparato Finnigan TSQ-70 o MAT-8230 para espectros de masa por bombardeo con átomos rápidos (FAB/LSI-EM). Algunos espectros de masas se obtuvieron del laboratorio de espectrometría de masas de la UC Berkeley. El dimensionamiento de partículas se realizó en un dimensionador de partículas submicrométricas NICOMP, modelo 370. La ultracentrifugación se realizó en una centrífuga de alta velocidad refrigerada Sorvall RC 5B de Du Pont Instruments. Los espectros UV se realizaron en un espectrofotómetro de red de diodos modelo 8452A de Hewlett Packard. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro Spex Fluorolog o un espectrofotómetro 650-40 de Perkin Elmer. Las mediciones de quimioluminiscencia se realizaron en un quimioluminómetro construido a medida equipado con láseres de 675 y 780 nm como fuentes luminosas.

Tolueno y THF se destilaron a partir de sodio sobre argón y diisopropiletilamina se secó sobre tamices de 3Å. 2-etoxietanol procedía de Aldrich Chemical Co. y se redistiló a vacío. Otros disolventes se usaron sin purificación, y la mayoría de las reacciones se llevaron a cabo bajo argón. El gel de sílice usado para cromatografía ultrarrápida era de 230-400 de malla ASTM, adquirido de Scientific Products mientras que las placas preparativas (1000 μ) y placas analíticas (250 μ) de CCF se adquirieron de Analtech.

1-Cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno (1-Cl-BPEA) y rubreno (5,6,11,12-tetrafenil-naftaceno) se adquirieron de Aldrich Chemical Co. Rubreno se recristalizó en cloruro de metileno y se almacenó a 4°C en un frasco marrón antes de su uso. Heptadecilbenceno se adquirió de Pfaltz y Bauer, Inc. (Waterbury, CT).

Partículas de poliestireno modificado con carboxilato (látex) se adquirieron de Seradyn, Inc. Las partículas eran de 203 \pm 4,0 nM. El área de aparcamiento del carboxilo era de 49,5 angstroms cuadrados (0,09 miliequivalentes/g). Los sólidos eran el 10% (100 mg/ml).

Dextrano T-500 procedía de Pharmacia (Piscataway, NJ). SIAX y TCEP se adquirieron de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). HBR-1 procedía de Scantibodies. Sulfato de gentamicina procedía de Life technologies. El conservante Kathon y otros reactivos comunes usados en la preparación de tampones, etc., se obtuvieron de Sigma, (St Louis, MO).

Ligadores, sondas y oligonucleótidos de ADN se adquirieron de Oligos Etc. Inc. (Wilsonville, OR) y se recibieron como polvos liofilizados que se disolvieron en agua estéril y se almacenaron congelados hasta su uso.

Las siguientes abreviaturas tienen los significados expuestos a continuación:

- HPLC - cromatografía líquida de alta resolución
- BSA - albúmina sérica bovina de Sigma Chemical Company, St. Louis MO
- g - gramos
- 5 • s - segundos
- ms - milisegundos
- mM - milimolar
- DMF - dimetilformamida
- 10 • DMSO - dimetilsulfóxido
- THF - tetrahidrofurano
- RMN - espectroscopía de resonancia magnética nuclear
- TMSCI - cloruro de tetrametilsililo
- EDAC – clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
- 15 • EDTA - ácido etilendiaminotetraacético
- MES – ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
- MOPS – ácido 3-(morfolino)propanosulfónico
- EtOAc - acetato de etilo
- Me - metilo
- 20 • OMe - metoxilo
- OAc - acetato
- MeOH - metanol
- EM - espectro de masas
- Naftalocianina (Nc) - t-butil₄-naftalocianina de bis(trihexilsilil)silicio
- Ftalocianina (Pc) - t-butil₄-ftalocianina de bis(trihexilsilil)silicio
- 25 • SIAX - 6-((yodoacetil)amino)hexanoato de succinimidilo
- ¹O₂ – oxígeno singlete
- SiO₂ - gel de sílice
- TEA - trietilamina
- 30 • THF - tetrahidrofurano
- TCEP - tris-carboxietil-fosfina
- IHBB – KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, trisHCl 10 mM, BSA 200 µg/ml, pH 8,3
- Perlas de DPA - partículas de látex teñidas con una mezcla de tioxeno y 9,10-difenilantraceno
- Perlas de TAR - partículas de látex teñidas con una mezcla de tioxeno, 1-cloro-9,10-bisfeniletinilantraceno y rubreno
- 35 • dopDPA – perlas de DPA dopadas con heptadecilbenceno como plastificante
- dopTAR – perlas de TAR dopadas con heptadecilbenceno como plastificante
- Tampón A – base Trisma 0,1 M, NaCl 0,3 M, EDTA 25 mM, dextrano T-500 1 mg/ml, BSA 1 mg/ml, HBR-1 al 0,3% (v/v), Kathon al 0,05%, sulfato de gentamicina al 0,01%, pH 8,2
- 40 • h - hora
- min. – minuto

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Síntesis de tioxeno C-28:

- 45 A una disolución de 4-bromoanilina (30 g, 174 mmoles) en DMF seca (200 ml) se le añadió 1-bromotetradecano (89,3 ml, 366 mmoles) y N,N-diisopropiletilamina (62,2 ml, 357 mmoles). Se calentó la disolución de reacción a 90°C durante 16 h bajo argón antes de enfriarse hasta temperatura ambiente. A esta disolución de reacción se le añadió
- 50 de nuevo 1-bromotetradecano (45 ml, 184 mmoles) y N,N-diisopropiletilamina (31 ml, 178 mmoles) y se calentó la mezcla de reacción a 90°C durante 15 h más. Tras enfriar, se concentró la disolución de reacción a vacío y se diluyó el residuo con CH₂Cl₂ (400 ml). Se lavó la disolución de CH₂Cl₂ con NaOH acuoso 1 N (2x), H₂O y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío proporcionando un aceite marrón oscuro (aproximadamente 110 g). Cromatografía en columna preparativa sobre gel de sílice mediante un sistema Waters 500 Prep LC eluyendo con hexano proporcionó un aceite amarillo que contenía principalmente el producto (4-bromo-N,N-di-(C₁₄H₂₉)-anilina)
- 55 junto con un componente minoritario 1-bromotetradecano. El último compuesto se eliminó de la mezcla mediante destilación a vacío (p.e. 105-110°C, 0,6 mm) dejando 50,2 g (51%) del producto como un aceite marrón. A una mezcla de virutas de magnesio (9,60 g, 395 mmoles) en THF seco (30 ml) bajo argón se le añadió gota a gota una disolución del producto de anilina sustituida anterior (44,7 g, 79 mmoles) en THF (250 ml). Se añadieron algunos cristales de yodo para iniciar la formación del reactivo de Grignard. Cuando la mezcla de reacción se calentó y
- 60 comenzó el reflujo, se reguló la tasa de adición para mantener un reflujo suave. Tras completarse la adición, se calentó la mezcla a reflujo durante una hora más. Se transfirió la disolución de sobrenadante enfriada a través de una cánula a un embudo de adición y se añadió gota a gota (a lo largo de 2,5 h) a una disolución de fenilglioxal (11,7 g, 87 mmoles) en THF (300 ml) a -30°C bajo argón. Se calentó gradualmente la mezcla de reacción hasta 0°C a lo largo de 1 h y se agitó durante 30 min. más. Se vertió la mezcla resultante en una mezcla de agua helada (800 ml) y acetato de etilo (250 ml). Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (3x). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con H₂O (2x), salmuera y se secaron sobre MgSO₄. La evaporación del disolvente
- 65

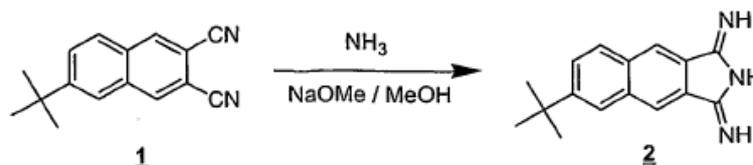
5 dio 48,8 g del producto bruto como un líquido aceitoso verde oscuro. Cromatografía en columna ultrarrápida de este líquido (elución en gradiente con hexano, acetato de etilo:hexano 1,5:98,5, 3:97, 5:95) proporcionó 24,7 g (50%) del producto de benzoína (LSI-EM (C₄₂H₆₉NO₂): [M-H]⁺ 618,6, ¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) concordaba con el producto de benzoína esperado. A una disolución del producto de benzoína anterior (24,7 g, 40 mmoles) en tolueno seco (500 ml) se le añadió secuencialmente 2-mercaptoetanol (25 g, 320 mmoles) y TMSCl (100 ml, 788 mmoles). Se calentó la disolución de reacción a reflujo durante 23 h bajo argón antes de enfriarse hasta temperatura ambiente. A esto se le añadió TMSCl adicional (50 ml, 394 mmoles); y se calentó la disolución de reacción a reflujo durante 3 h más. Se enfrió la disolución resultante, se hizo básica con NaOH acuoso 2,5 N frío y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con NaHCO₃ acuoso saturado (2x) y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío dando un líquido aceitoso marrón. Cromatografía en columna preparativa sobre gel de sílice mediante un sistema Waters 500 Prep LC (elución en gradiente con hexano, acetato de etilo:hexano 1:99, 2:98) proporcionó 15,5 g (60%) del tioxeno C-28 como un aceite naranja amarillento (LSI-EM (C₄₄H₇₁NOS): [M-H]⁺ 661,6, ¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) concordaba con el producto de tioxeno C-28 esperado 2-(4-(N,Ndi-(C₁₄H₂₉)-anilino)-3-fenil-tioxeno.

15 Síntesis de sensibilizador de ftalocianina

Se añadió metal de sodio, recién cortado (5,0 g, 208 mmoles), a 300 ml de metanol anhidro en un matraz de 3 bocas de dos litros equipado con un agitador magnético, refrigerante de reflujo, un tubo secador y un burbujeador de gas. Tras haberse disuelto el sodio completamente, se añadió 4-t-butil-1,2-dicianobenceno (38,64 g, 210 mmoles, de TCI Chemicals, Portland OR) usando un embudo. La mezcla se volvió transparente y la temperatura aumentó hasta aproximadamente 50°C. En este punto se introdujo una corriente continua de gas amoníaco anhidro a través del burbujeador de vidrio en la mezcla de reacción durante 1 h. Entonces se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 4 h. mientras continuaba la corriente de amoníaco durante el transcurso de la reacción, de modo que empezó a precipitar sólido. Se evaporó la suspensión resultante hasta sequedad (aspiradora doméstica) y se suspendió el residuo en agua (400 ml) y se filtró. Se secó el sólido (60°C, aspiradora doméstica, P₂O₅). El rendimiento del producto (1,3-diiminoisoidolina, 42,2 g) fue casi cuantitativo. Se usó este material para la siguiente etapa sin purificación adicional. A un matraz de tres bocas de un litro equipado con un condensador y un tubo secador se le añadió el producto anterior (18 g, 89 mmoles) y quinolina (200 ml, Aldrich Chemical Company, St. Louis MO). Se añadió tetracloruro de silicio (11 ml, 95 mmoles, Aldrich Chemical Company) con una jeringuilla a la disolución agitada a lo largo de un periodo de 10 minutos. Tras completarse la adición, se calentó la mezcla de reacción hasta 180-185°C en un baño de aceite durante 1 h. Se dejó enfriar la reacción hasta temperatura ambiente y se añadió cuidadosamente HCl concentrado para acidificar la mezcla de reacción (pH 5-6). Se enfrió la mezcla de reacción marrón oscuro y se filtró. Se lavó el sólido con 100 ml de agua y se secó (aspiradora doméstica, 60°C, P₂O₅). Se colocó el material sólido en un matraz de fondo redondo de 1 litro y se añadió ácido sulfúrico concentrado (500 ml) con agitación. Se agitó la mezcla durante 4 h. a 60°C y entonces se diluyó cuidadosamente con hielo picado (2000 g). Se filtró la mezcla resultante y se lavó el sólido con 100 ml de agua y se secó. Se transfirió el sólido azul oscuro a un matraz de fondo redondo de 1 litro, se añadió amoníaco concentrado (500 ml), y se calentó la mezcla y se agitó a reflujo durante 2 h, se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró. Se lavó el sólido con 50 ml de agua y se secó a vacío (aspiradora doméstica, 60°C, P₂O₅) dando 12 g de producto tetra-t-butil-ftalocianina de silicio como un sólido azul oscuro. Se añadieron 3-picolina (12 g, de Aldrich Chemical Company), tri-n-butilamina (anhidra, 40 ml) y tri-n-hexil-clorosilano (11,5 g) a 12 g del producto anterior en un matraz de tres bocas de un litro, equipado con un agitador magnético y un refrigerante de reflujo. Se calentó la mezcla a reflujo durante 1,5 h y entonces se enfrió hasta temperatura ambiente. Se separó por destilación la picolina a alto vacío (bomba de aceite a aproximadamente 1 mm Hg) hasta sequedad. Se disolvió el residuo en CH₂Cl₂ y se purificó usando una columna de gel de sílice (hexano) dando 10 g de producto puro tetra-t-butil-ftalocianina de di-(tri-n-hexilsilil)-silicio como un sólido azul oscuro. (LSI-EM: [M-H]⁺ 1364,2, espectros de absorción: metanol: 674 nm (ε 180.000): tolueno 678 nm, ¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃): δ: -2,4 (m,12H), -1,3 (m, 12H), 0,2-0,9 (m, 54H), 1,8 (s, 36H), 8,3 (d, 4H) y 9,6 (m, 8H) concordaba con el producto esperado anterior.

50 Síntesis de sensibilizador de naftalocianina

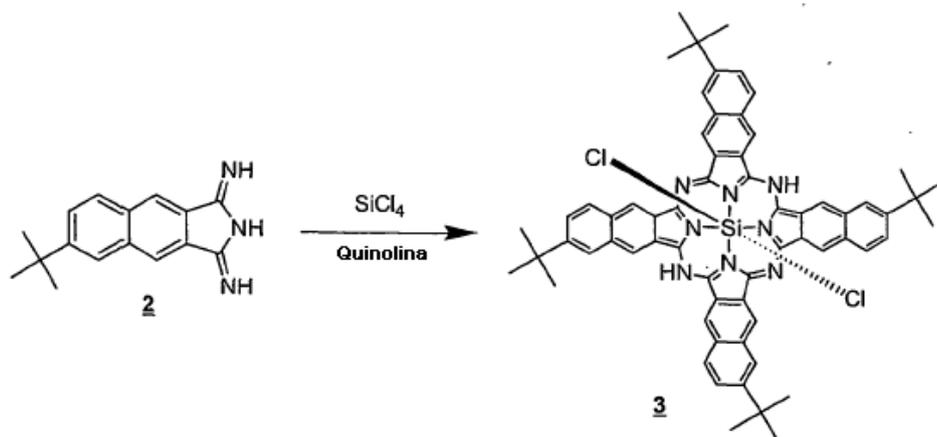
1. Preparación de 6-t-butil-diiminobenc(f)isoindolina (2)



55 Se suspendió el 6-t-butil-2,3-dicianonaftaleno (1) (9,07 g, 38,7 mmoles) en 50 ml de MeOH. Mientras se agitaba bajo argón, se añadieron 8,5 ml de NaOMe 1,05 N/MeOH (recién preparado a partir de Na⁰) y se burbujó la suspensión amarillo claro con gas NH₃ durante 1 h a temperatura ambiente. La dilución con 75 ml adicionales de MeOH no disolvió la suspensión fina. Se continuó el burbujeo con NH₃ a 65° durante 2 h hasta que se aclaró la suspensión, y luego 1 h más. Se eliminaron los componentes volátiles mediante evaporación rotatoria, y se trituró el semisólido adherido con 200 ml de agua. Tras secar a vacío (< 1 mmHg) durante la noche a temperatura ambiente, se molieron

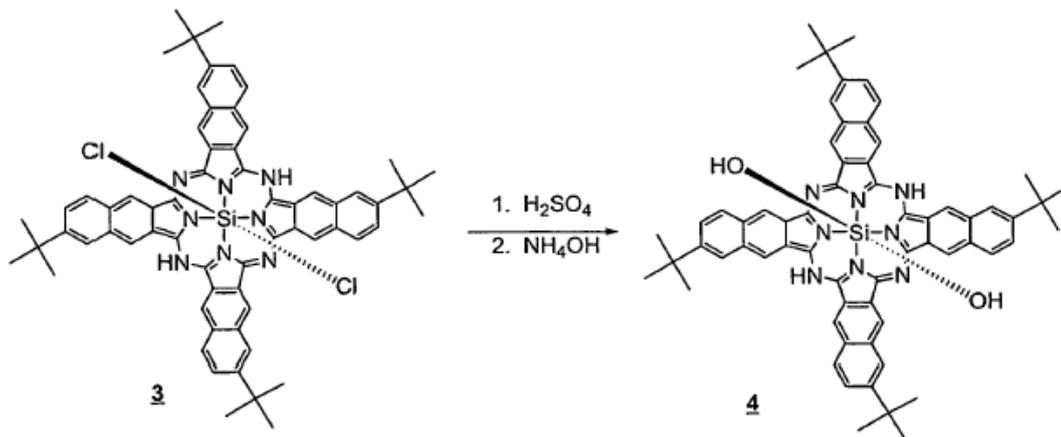
los 9,2 g de sólido con mortero y mano de mortero hasta un polvo fijo de color marrón verdoso. RMN (250 MHz, CDCl_3) mostró la ausencia del dicianonaftaleno y concordaba con el producto deseado. CCF (MeOH/ CH_2Cl_2 2:1) era comparable a una muestra de nor-butyl-diiminobencisoindolina.

5 2. Preparación de tetra-t-butil-naftalocianina de diclorosilicio ($t\text{-bu}_4\text{-NcCl}_2$) (3)

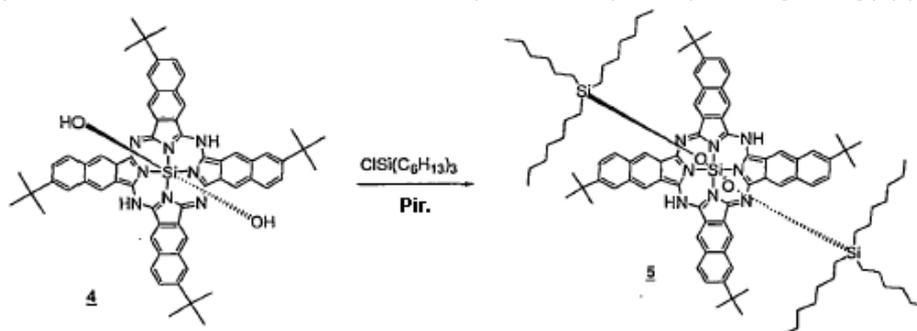


La 6-t-butil-diiminobencisoindolina (2) (9,01 g, 35,9 mmoles) preparada tal como se describió anteriormente, se agitó en 100 ml de quinolina. Se añadió tetracloruro de silicio (4,0 ml, 35 mmoles) a incrementos de 1 ml a una tasa tal (~30 min.) que la exoterma suave se mantuvo por debajo de 30° . Entonces se calentó gradualmente la reacción mediante baño de aceite desde 60° hasta 180° , y se agitó bajo argón durante 1 h a esa temperatura. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se pipeteó la reacción en dos frascos para centrífuga de polipropileno de 250 cc, que contenía cada uno 150 ml de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1. Se enjuagó el residuo con 50 ml de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1 en los dos frascos. Los frascos se invirtieron varias veces para mezclar el contenido, y se centrifugaron durante 10 min. a 6K rpm, se decantaron, y se resuspendió el sólido en 200 ml de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1. Se repitió el proceso 3x, y se secó a vacío el sólido final a $60^\circ\text{C}/\text{P}_2\text{O}_5$ proporcionando 8,9 g del producto bruto (3), que se trituró hasta un polvo verde con mortero y mano de mortero y se usó directamente en la siguiente etapa. CCF (MeOH/ CH_2Cl_2 2:1) mostró la ausencia de material de partida.

3. Preparación de tetra-t-butil-naftalocianina de dihidroxisilicio ($t\text{-bu}_4\text{-Nc}(\text{OH})_2$) (4)



Una parte (5,8 g, 5,7 mmoles) de la $t\text{-bu}_4\text{-NcCl}_2$ (3), preparada tal como se describió anteriormente, se disolvió en 150 ml de H_2SO_4 conc. Se agitó la disolución violeta oscuro transparente durante 4 h a 60° , se enfrió y se vertió en 800 cc de hielo. Se compactó la suspensión marrón mediante centrifuga (6K rpm, 6 min.), y se lavó el sólido dos veces con porciones de 200 ml de agua en cada uno de los cuatro frascos de centrífuga de 250 cc. Se secó a vacío el sólido final a $60^\circ\text{C}/\text{P}_2\text{O}_5$ proporcionando 6,1 g de sólido negro (v. marrón rojizo oscuro). Se enjuagó este sólido de los frascos con 250 ml de NH_4OH concentrado hacia un matraz. Se calentó gradualmente la suspensión verde oscuro hasta 100°C . Tras 30 min., bajó la espumación, y se continuó el calentamiento durante dos horas. Tras enfriar, se enjuagó la suspensión con 200 ml de agua hacia dos frascos de centrífuga de 250 cc. Se lavó el sólido repetidamente mediante centrifugación (3x, de 6K a 12 K rpm) con porciones de 150 ml de agua/frasco. Debido a la escasa compactación, se realizó una centrifugación final en dos tubos de 30 cc con porciones de 25 ml de agua a 16 K rpm. Se secó a vacío el sólido (16 h, 30 mmHg, 60°C , P_2O_5) y se pesó (2,822 g). El secado adicional (3 d, < 1 mmHg, 100°) mostró que el sólido parcialmente secado contenía todavía un 5% de agua (dando como resultado rendimientos reducidos en algunas reacciones). La identidad del producto se confirmó mediante EM (M^+ 998).

4. Preparación de tetra-t-butilnftalocianina de bis(tri-n-hexilsilil)silicio (t-bu₄-Nc[hex₃Si]₂) (5)

La t-bu₄-Nc(OH)₂ (4) (1,61 g, 1,6 mmoles), preparada tal como se describió anteriormente, se disolvió en una disolución de 15 ml de cloruro de tri-n-hexilsililo / 30 ml de piridina anhidra. Tras burbujear con argón, se calentó la disolución a 120° durante 1 h. Calentar la reacción durante 2 h más no alteró la distribución del producto tal como se determina mediante CCF (SiO₂, CH₂Cl₂ al 10%/ hexano). Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente, y se repartió la mezcla de reacción entre 150 ml de hexano y 100 ml de agua. Se agitó la mezcla durante 30 min. hasta que la fase de hexano se clareó hasta un color verde oscuro. Se eliminó la fase acuosa y se lavó la fase orgánica dos veces con porciones de 150 ml de agua, hasta que la fase acuosa final fue incolora (pH aproximadamente 6). Se filtró la fase orgánica (lana de vidrio/embudo), se concentró hasta aproximadamente 25 ml, y se sometió a cromatografía (SiO₂; CH₂Cl₂ al 5%/ hexano). Fue necesaria la recromatografía (cromatotrón: rotor de SiO₂, CH₂Cl₂ del 0 al 10%/hexano) para separar los isómeros de t-butilo. Se aisló una parte del isómero principal (94 mg) y se usó como tal para la tinción de perlas.

15 Síntesis de hidroxipropilaminodextrano.

Se preparó hidroxipropilaminodextrano disolviendo 100 g de dextrano T-500 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) en 500 ml de agua en un matraz de fondo redondo de 3 bocas con un agitador mecánico y embudo de goteo. A la disolución se le añadieron 45 g de hidróxido de sodio, 50 mg de EDTA, 50 mg de NaBH₄, 50 mg de hidroquinona y 200 g de N-(2,3-epoxipropil)ftalimida. Se calentó la mezcla y se agitó en un baño de agua a 90°C durante dos horas. Se precipitó una pequeña alícuota tres veces en metanol y se analizó mediante RMN. La aparición de un pico a 7,3-7,6 indicaba la incorporación de ftalimida. Se precipitó la mezcla de reacción principal mediante la adición a 3,5 l de metanol, tras lo cual se recogió el sólido. Se eliminó el grupo protector de ftalimida disolviendo el producto anterior en 500 ml de tampón acetato 0,1 M, añadiendo 50 ml de hidrazina al 35%, y ajustando el pH a 3,5. Se calentó la mezcla a 80°C durante 1 h, se reajustó el pH a 3,2, y se calentó la mezcla durante media hora más. Se precipitó una alícuota tres veces en metanol. RMN mostró que el grupo ftalimida ya no estaba presente. Se neutralizó la mezcla de reacción a pH 8 y se almacenó a temperatura ambiente.

Se purificó el producto mediante filtración con flujo tangencial usando un filtro cortador de peso molecular de 50.000, lavando con agua, HCl 0,01 M, NaOH 0,01 M, y finalmente agua. Se concentró la disolución de producto mediante filtración a 700 ml, luego se liofilizó. La determinación de aminas reactivas usando sulfonato de trinitrobenzeno dio aproximadamente 1 amina por 16 residuos de glucosa.

35 Preparación de perlas de sensibilizador teñidas con ftalocianina

Se prepararon las perlas de sensibilizador colocando 600 ml de látex modificado con carboxilato (Seradyn) en un matraz de fondo redondo de tres bocas equipado con un agitador mecánico, un tapón de vidrio con a termómetro unido al mismo en una boca, y un embudo en la boca opuesta. El matraz se ha sumergido en un baño de aceite mantenido a 94±1°C. Se añadieron las perlas al matraz a través del embudo en la boca y se enjuagó el recipiente de las perlas con 830 ml de etoxietanol, 1700 ml de etilenglicol y 60 ml de NaOH 0,1 N y se añadió el enjuague al matraz a través del embudo. Se reemplazó el embudo por un septo de caucho 24-40. Se agitaron las perlas a 765 rpm a una temperatura de 94°C durante 40 min.

Se disolvió tetra-t-butil-ftalocianina de silicio (10,0 g) en 300 ml de alcohol bencílico a 60+/-5°C. Se añadieron ochenta y cinco (85) ml al matraz de fondo redondo anterior a través del septo por medio de una jeringuilla de 100 ml calentada hasta 120+/- 10°C a una velocidad de 3 ml por min. La disolución de ftalocianina restante se añadió entonces de manera similar. La jeringuilla y el frasco que contenían originalmente la ftalocianina se enjuagaron con 40 ml de alcohol bencílico y se transfirieron a un matraz de fondo redondo. Tras 15 min. se añadieron gota a gota 900 ml de agua desionizada y 75 ml de NaOH 0,1 N a lo largo de 40 min. Se dejó disminuir lentamente la temperatura del baño de aceite hasta 40+/-10°C y entonces se interrumpió la agitación. Entonces se filtraron las perlas a través de un filtro de poliéster de 43 micras y se sometieron a un aparato de filtración con flujo tangencial Microgon (Microgon Inc., Laguna Hills, CA) usando etanol:agua, de 100:0 a 10:90, y luego se filtró a través de un filtro de poliéster de 43 micras.

Preparación de perlas de sensibilizador teñidas con naftalocianina

Se mezcló una suspensión al 10% de perlas de látex carboxilado (4,4 ml) con 4,4 ml de etoxietanol, 8,8 ml de etilenglicol, y 0,44 ml de disolución de hidróxido de sodio 0,1 N. Se disolvió naftalocianina (0,475 mg) en 0,4 ml de alcohol bencílico. Se transfirió un ml de la suspensión de perlas diluida (25 mg de perlas) a un tubo de vidrio de 13 x 100 mm y se colocó en un bloque térmico mantenido a 95 grados. Se transfirieron doscientos μ l de la disolución de colorante a un tubo separado y se colocaron en el bloque térmico. Tras dejar que la temperatura se equilibrara durante unos minutos, se mezcló rápidamente el contenido de los tubos y se continuó el calentamiento durante 20 minutos más. Se retiró la suspensión de perlas teñida del bloque térmico y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, momento en el que se diluyó con 3 ml de etanol y se mezcló meticulosamente. Entonces se centrifugó la suspensión formando un sedimento de perlas. Se desechó el sobrenadante y se suspendió el sedimento en etanol al 50% en agua mediante sonicación. Se repitió la centrifugación y se suspendió el sedimento en etanol al 10% en agua. Se centrifugó la suspensión a velocidad lenta para sedimentar una cantidad traza de residuo del procedimiento de tinción. Se decantaron las perlas que permanecieron en el sobrenadante y se almacenaron a 4 grados C.

Preparación de perlas de sensibilizador de ftalocianina recubiertas con hidroxipropilaminodextrano

Se preparó una disolución de hidroxipropilaminodextrano a 2 mg/ml en MES 50 mM pH 6. Se añadieron gota a gota ciento cincuenta mg de perlas de sensibilizador de ftalocianina en 7,5 ml de agua a 7,5 ml de la disolución de hidroxipropilaminodextrano mientras se agitaba con vórtex. Se añadieron ciento ochenta y ocho μ l de disolución de EDAC (80 mg/ml) en agua a la mezcla de recubrimiento mientras se agitaba con vórtex. Se incubó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. Se diluyó la mezcla con 12 ml de agua y se centrifugó. Se desechó el sobrenadante y se suspendió el sedimento de perlas en 40 ml de agua mediante sonicación. Se lavaron las perlas 3 veces con agua (40 ml por lavado) mediante centrifugación repetida y suspensión mediante sonicación. Se suspendió el sedimento final en 5 ml de agua.

Preparación de perlas de sensibilizador de naftalocianina recubiertas con hidroxipropilaminodextrano

Se preparó una disolución de hidroxipropilaminodextrano a 10 mg/ml en MES 50 mM pH 6. Se añadieron lentamente veinte mg de las perlas de sensibilizador de naftalocianina en 1 ml de etanol al 10% en agua a 1 ml de la disolución de hidroxipropilaminodextrano mientras se agitaba con vórtex. Se añadieron dos mg de EDAC disueltos en 0,2 ml de agua a la mezcla de recubrimiento mientras se agitaba con vórtex. Tras una incubación durante la noche a temperatura ambiente, se centrifugó la mezcla, se desechó el sobrenadante, y se suspendió el sedimento de perlas en 2 ml de agua mediante sonicación. El lavado con agua se repitió 2 veces mediante centrifugación y se suspendió el sedimento de perlas final en 1 ml de agua.

Preparación de perlas de agente quimioluminiscente dopTAR recubiertas con hidroxipropilaminodextrano

Se calentó una suspensión al 10% de perlas de látex carboxilado (120 ml) hasta 93°C en un matraz de fondo redondo de tres bocas, entonces se mezcló con 166 ml de etoxietanol, 336 ml de etilenglicol, y 12 ml de NaOH 0,1 M. Se añadieron un agitador mecánico y un termómetro, y se llevó la mezcla hasta 95°C con agitación, luego se agitó durante 40 minutos más. En un matraz separado, se disolvieron 2,45 g de tioxeno C-28, 191,8 mg de 2-cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno, y 323,9 mg de rubreno en 264 ml de etoxietanol y se calentaron hasta 95°C con agitación hasta su disolución. Se vertió la disolución de colorante en la suspensión de perlas y se agitó durante 20 min. a 95°C, entonces se dejó enfriar lentamente hasta aproximadamente 47°C y se filtró a través de un filtro de poliéster de 43 μ m para eliminar cualquier residuo generado durante el procedimiento de tinción. Se lavaron las perlas mediante filtración con flujo tangencial usando un aparato Microgon con un filtro P698/4. Tras cebar el sistema con disolvente de lavado (etoxietanol y etilenglicol 1:2 v/v), se añadió la mezcla de perlas teñidas, se concentró hasta aproximadamente 20 mg/ml, luego se lavó con 6 litros de disolvente de lavado y 4,8 l de etanol al 10% v/v en agua ajustado a pH 10 con NaOH. Se concentraron las perlas de TAR hasta aproximadamente 50 mg/ml durante el lavado, luego se almacenaron a 4°C protegidos frente a la luz.

Se incorporó un plastificante en las perlas para mejorar la tasa de descomposición de luminiscencia. Se preparó una mezcla que contenía 250 μ l de n-heptadecilbenceno, 20 ml de etanol, y 0,5 g de hidroxipropilaminodextrano disueltos en 25 ml de MES 50 mM pH 6. Se calentó la mezcla hasta 80°C en un baño de aceite y se agitó enérgicamente para dispersar el plastificante. También se calentó hasta 80°C una segunda mezcla que contenía 40 ml de perlas de TAR teñidas anteriores (diluidas hasta 25 mg/ml en etanol al 10%) y 30 ml de MES 50 mM pH 6. Se combinaron las dos mezclas y se dejó agitar a 80°C durante la noche.

Tras enfriar, se separaron las perlas, mediante pipeta, a partir de una pequeña cantidad de plastificante en exceso que flotaba en la parte superior de la suspensión de perlas. Se añadió EDAC (200 mg) en 3 ml de agua, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h. Entonces se centrifugó la mezcla para recuperar las perlas. Se suspendió el sedimento de perlas mediante sonicación y se lavó con tres porciones de 40 ml de agua alternando centrifugación y suspensión mediante sonicación. Entonces se suspendió el sedimento de perlas final en aproximadamente 35 ml de agua.

Preparación de perlas de agente quimioluminiscente dopDPA recubiertas con hidroxipropilaminodextrano

Se mezcló una suspensión al 10% de perlas de látex carboxilado (10 ml) con 10 ml de etoxietanol, 20 ml de etilenglicol, y 1 ml disolución de hidróxido de sodio 0,1 N en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con agitador magnético. Se sujetó el matraz en un baño de aceite mantenido a 95 grados C. En un matraz separado se disolvieron 200 mg de C28 tioxeno y 30 mg de 9,10-difenilantraceno en 20 ml de etoxietanol y se llevaron hasta 95 grados C. Se mezcló rápidamente el contenido de los matraces y se continuó el calentamiento a 95 grados C durante 90 min. Se retiró el matraz del baño de aceite y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Tras enfriar, se diluyó la mezcla con 60 ml de etanol, se mezcló meticulosamente, y se recogieron las perlas teñidas mediante centrifugación. Se desechó el sobrenadante y se suspendió el sedimento de perlas en 20 ml de etanol mediante sonicación. Se repitió la centrifugación y se lavaron las perlas con una segunda porción de 20 ml de etanol. Tras una centrifugación final, se suspendieron las perlas en 40 ml de agua.

Se incorporó un plastificante en las perlas para mejorar la tasa de descomposición de luminiscencia. Se colocaron las perlas de DPA teñidas anteriores en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, equipado con agitador magnético, y se colocaron en un baño de aceite a 80 grados C. Se colocaron cuarenta ml de etanol en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se añadieron 300 mg de plastificante de heptadecilbenceno (HB). Se equilibró la disolución en el baño de aceite y entonces se añadió rápidamente a la suspensión de perlas con mezclado enérgico. Se incubó la mezcla en el baño de aceite a 80 grados C durante 90 min.

Mientras estaba incubando la mezcla de perlas/plastificante, se preparó una disolución de hidroxipropilaminodextrano. Se disolvieron trescientos veinte mg de hidroxipropilaminodextrano en 16 ml de MES 50 mM pH 6 y se calentó la solución hasta 80 grados C en el baño de aceite. Entonces se añadió la solución de una vez a la suspensión de perlas con agitación enérgica. Se equipó el matraz con un condensador de agua para minimizar las pérdidas por evaporación y se continuó el calentamiento a 80 grados C durante la noche.

Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente y se añadieron 50 mg de EDAC en agua con agitación. Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 2 h, momento en el cual se añadieron 20 ml de etanol y se centrifugó la suspensión. Se desechó el sobrenadante y se suspendieron las perlas en 40 ml de etanol acuoso al 50% mediante sonicación. Se repitió la centrifugación y se suspendieron las perlas en NaCl 0,5 M mediante sonicación. Tras una centrifugación final se centrifugaron las perlas en etanol acuoso al 10%, NaCl 50 mM.

Preparación de partículas de sensibilizador de ftalocianina recubiertas de oligonucleótido A₂₄P(c-A₂₄)

Se suspendieron sesenta y cinco mg de perlas de sensibilizador de ftalocianina recubiertas con hidroxipropilaminodextrano en 5 ml de MOPS 50 mM pH 7. Se preparó una disolución de SIAX al 10% (p/v) en DMF y se añadieron 77 µl a la suspensión de perlas mientras se agitaba con vórtex. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 90 min. en la oscuridad y entonces se añadió una segunda alícuota de 77 µl de disolución de SIAX y se incubó la mezcla durante 60 min. más. Se centrifugó la suspensión y se desechó el sobrenadante. Se suspendió el sedimento de perlas en 6 ml de agua mediante sonicación y se repitió la centrifugación. Se suspendió el sedimento en 6,5 ml de agua y se almacenó a 4 grados C.

En la preparación para el acoplamiento de oligonucleótidos, se centrifugaron las perlas, se desechó el sobrenadante, y se añadieron 1,34 ml de tampón de acoplamiento al sedimento. El tampón de acoplamiento consiste en la siguiente mezcla: (900 µl de borato 0,2 M, EDTA 2 mM pH 9 y 333 µl de borato 0,4 M pH 9,45 y 1000 µl de Na₂SO₄ 2 M) que se había desgasificado y saturado con argón. Se añadieron nueve µl de detergente Tween 20 al 10% a la mezcla de tampón de acoplamiento tras desgasificar y saturar con argón.

Se disolvió en agua el oligonucleótido 5' A₂₄ (SEQ ID NO:1) modificado en el extremo 3' con -PO₂OCH₂CH₂CH₂SSCH₂CH₂CH₂OH y se determinó la concentración mediante la densidad óptica a 260 nm. Usando el coeficiente de extinción suministrado por el vendedor, se halló que la concentración era de 915,8 nmoles/ml. Se usaron aproximadamente doce nmoles de oligonucleótido por mg de perlas para el procedimiento de acoplamiento.

Se colocaron setecientos µl de disolución de oligonucleótido en un tubo de centrifuga y se añadieron 76 µl de NaOAc 2,5 M pH 5,3. Se añadieron ciento cuarenta y siete µl de TCEP 20 mM en agua a la disolución de oligonucleótidos y se incubó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadieron cuatro volúmenes de etanol 200° (de proof) a la mezcla para precipitar el oligonucleótido reducido. La precipitación se facilitó colocando la mezcla en un congelador a -20 grados C durante 1 hora. Se recogió el precipitado mediante centrifugación y entonces se disolvió en 495 µl de Na₂HPO₄ 5 mM, EDTA 2 mM pH 6 que se habían desgasificado y saturado con argón.

Entonces se añadió la disolución de oligonucleótido al sedimento de perlas con tampón de acoplamiento y se sonicó la mezcla para suspender las perlas. Se incubó la suspensión a 37 grados C durante 23 h.

65

Se ocuparon los grupos de yodo residuales sobre la cubierta de yodoaminodextrano mediante reacción con ácido mercaptoacético. Se centrifugó la suspensión de perlas y se retiró el sobrenadante. Se suspendió el sedimento mediante sonicación en 5 ml de ácido mercaptoacético 10 mM en borato 0,4 M pH 9,45 y se incubó la mezcla a 37 grados C durante 1 h. Se recuperaron las perlas mediante centrifugación y se suspendieron en 5 ml de tampón de bloqueo: (NaCl 0,1 M, glicina 0,17 M, BSA 10 mg/ml, Tween 20 al 0,1%, EDTA 1 mM pH 9,2 se filtró de manera estéril y se añadió ADN de timo de ternera 50 µl/ml). Se incubó la mezcla durante 3 h a 37 grados C. Tras la centrifugación, se lavaron las perlas dos veces mediante centrifugación con 5 ml de tampón A por lavado. Se suspendió el sedimento final en 6 ml de tampón IHBB y se incubó a 95 grados C durante 90 min. Tras enfriar, se centrifugaron las perlas, se desechó el sobrenadante, y se suspendió el sedimento en 6 ml de volúmenes iguales de NaOAc 0,125 M pH 5 y disolución de peróxido de hidrógeno al 30%. Incubar a 37 grados durante 2,5 horas. Se centrifugó la mezcla, se desechó el sobrenadante, y se lavaron las perlas 3 veces mediante centrifugación con tampón de almacenamiento (KCl 50 mM, tris 10 mM, EDTA 4 mM, BSA acetilado al 0,2% pH 8,2) usando 5 ml de tampón por lavado. Se suspendió el sedimento final mediante sonicación en 6 ml de tampón de almacenamiento y se almacenó a 4 grados protegido frente a la luz.

Preparación de partículas de agente quimioluminiscente dopDPA recubiertas con oligonucleótido (AGTA)₆ (dopDPA-(AGTA)₆)

Se prepararon las perlas recubiertas con oligonucleótido mediante un procedimiento similar al descrito anteriormente para la preparación de perlas de Pc-A₂₄. Sin embargo, sólo las perlas de sensibilizador se trataron con peróxido. Se empleó el oligonucleótido 5'-(AGTA)₆-3' (SEQ ID NO:2) modificado en el extremo 3' con -PO₂OCH₂CH₂CH₂SSCH₂CH₂CH₂OH.

Preparación de partículas de sensibilizador de naftalocianina recubiertas con oligonucleótido (ATAG)₆ Nc-(ATAG)₆

Se prepararon las perlas recubiertas con oligonucleótido mediante un procedimiento similar al descrito anteriormente para la preparación de perlas de Pc-A₂₄. Sin embargo, sólo las perlas de sensibilizador se trataron con peróxido. Se empleó el oligonucleótido 5'-(ATAG)₆-3' (SEQ ID NO:3) modificado en el extremo 3' con -PO₂OCH₂CH₂CH₂SSCH₂CH₂CH₂OH.

Preparación de partículas de agente quimioluminiscente dopTAR recubiertas con oligonucleótido A₂₄ (dopTAR-A₂₄)

Se prepararon las perlas recubiertas con oligonucleótido mediante un procedimiento similar al descrito anteriormente para la preparación de perlas Pc-A₂₄. Sin embargo, sólo las perlas de sensibilizador se trataron con peróxido. Se empleó el oligonucleótido 5' A₂₄ (SEQ ID NO:1) modificado en el extremo 3' con -PO₂OCH₂CH₂CH₂SSCH₂CH₂CH.

Preparación de partículas de sensibilizador de ftalocianina recubiertas con oligonucleótido (AGTA)₆ (Pc-(AGTA)₆)

Se prepararon las perlas recubiertas con oligonucleótido mediante un procedimiento similar al descrito anteriormente para la preparación de perlas Pc-A₂₄. Sin embargo, sólo las perlas de sensibilizador se trataron con peróxido. Se empleó el oligonucleótido 5'-(AGTA)₆-3' (SEQ ID NO:2) modificado en el extremo 3' con -PO₂OCH₂CH₂CH₂SSCH₂CH₂CH₂OH.

Secuencias de ligador y sonda de oligonucleótido

Sonda RL-2:

5' - CTC ACA GTC AGA AAT TGG AGT CTA CTT ACT TAC TTA CTT ACT X - 3'
(SEQ ID NO:4)

Sonda RL-3:

5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA GAC TTT TTC TAT TCG CAG CGC X - 3'
(SEQ ID NO:5)

Sonda RF-3:

5' - GAC AGT GTA GAT AGA TGA CAG TCG CTA TCT ATC TAT CTA TCT AT X
- 3' (SEQ ID NO:6)

Ligador AL-1:

5' - ACT GTC ATC TAT CTA CAC TGT TTT TGC GCT GCG AAT AGA AAA AGT
C - 3' (SEQ ID NO:7)

Ligador SP-1:

5' - B TA CTT ACT TAC TTA CTT ACT TAC TGA ATG GGT TAG AGT GCA TCC
AGT GCT ATC TAT CTA TCT ATC TAT CTA T - 3' (SEQ ID NO:8)

Ligador SO:

5' – CTC CAA TTT CTG ACT GTG AGT TTT TGC GCT GCG AAT AGA AAA AGT
CT – 3' (SEQ ID NO:9)

Ligador CL-1:

5' – B TA CTT ACT TAC TTA CTT ACT TAC TGA ATG GGA TAG AGT GCA TCC
AGT GTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T – 3' (SEQ ID NO:10)

Ligador HA-1:

5' – CTA TCT ATC TAT CTA TCT ATC TAT GAA TGG GAT AGA GTG CAT CCA
GTG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T – 3' (SEQ ID NO:11)

10 X = extremo terminal en 3' bloqueado con amina C₇ (CH₂CH(CH₂OH)CH₂CH₂CH₂CH₂NH₃)

B = biotina

Ejemplo 1

Ensayo según el esquema 1

Se emplearon ligadores de oligonucleótidos que tenían secuencias terminales complementarias a las secuencias de oligonucleótidos unidas a las perlas y se sintetizaron por Oligos Etc. Las perlas expuestas anteriormente, en concreto, ⁵(ATAG)₃-Nc se unieron a la cola complementaria, concretamente, ⁵(CTAT)₃, del ligador SP-1 identificado anteriormente como SEQ ID NO:8. De manera similar, el otro extremo del ligador era complementario a una perla de agente quimioluminiscente tal como se muestra en el esquema 1 (figura 1). En presencia de ligador, las dos perlas se pusieron en contacto en un ensayo de tipo intercalado "sándwich" sencillo y, debido a su estrecha proximidad y la transferencia del oxígeno singlete, generaron una señal que era directamente proporcional a la concentración de ligador.

Protocolo 1:

<u>Mezcla madre</u>	<u>por ensayo</u>	<u>mezcla madre</u>
agua	39 µl	1,56 ml
10X IHBB	5 µl	200 µl
dopDPA-(AGTA) ₆ (5 mg/ml)	0,5 µl	20 µl
Pc-A ₂₄ (5 mg/ml)	0,25 µl	10 µl
Nc-(ATAG) ₆ (5 mg/ml)	0,25 µl	10 µl
	45 µl	1,8 ml

30 Se diluyeron de forma reciente disoluciones de trabajo de ligador a partir de concentrados congelados en agua libre de ADNasa que contenía ARNt 2 µg/ml.

Disoluciones de trabajo de ligador CL-1: 1 nM, 500 pM, 100 pM, 50 pM, 10 pM, 5 pM y 0 pM (agua)

35 Disoluciones de trabajo de ligador SP-1: 1 nM, 500 pM, 100 pM, 50 pM, 10 pM, 5 pM, y 0 pM (agua)

Disoluciones de trabajo de ligadores mixtos (CL-1/SP-1): 500/500 pM, 500/50 pM, 50/500 pM, 50/50 pM

40 Se colocaron cuarenta y cinco (45) µl de mezcla madre en un tubo de PCR y 5 µl de disolución de trabajo y se mezclaron. Se completó el material con 20 µl de aceite mineral y se incubó en un ciclador de PCR durante 2 min. a 95°C, durante 15 min. a 50°C, y durante 60 min. a 37°C. Se transfirieron los tubos a un bloque térmico mantenido a 37°C mientras se tomaban lecturas de señal. Cada muestra se leyó tres veces.

45 Se realizó el promedio de las tres lecturas y se construyó una curva patrón. A partir de la curva patrón se determinaron las concentraciones de los ligadores en las muestras de ligadores mixtos.

Ensayo:

50 Se generaron curvas patrón para los ligadores CL-1 y SP-1 usando el protocolo 1. Se colocaron alícuotas iguales (normalmente de 45 µl) de una "mezcla madre" compuesta por las dos perlas de sensibilizador y la perla de agente quimioluminiscente en tampón IHBB en cada uno de los diversos tubos de PCR. Entonces, se añadió una alícuota (normalmente de 5 µl) de patrón de ligador diluido en serie seguido de aceite mineral (20 µl). Se prepararon de forma

reciente disoluciones de trabajo de ligador a partir de una disolución madre concentrada. Se preparó un conjunto similar de patrones usando el segundo ligador. Tras la incubación, se leyeron las muestras con lector de láser dual y los resultados se resumen en la tabla 1. Cada muestra se iluminó en primer lugar con el láser de 675 nm seguido del láser de 780 nm. La lectura se repitió tres veces y se calculó su promedio. Se corrigió el promedio restando la lectura obtenida cuando no estaba presente ningún ligador en la muestra. Entonces, se usaron los promedios corregidos para construir curvas patrón de ligador (figura 2). De manera similar, se preparó un conjunto de muestras usando la "mezcla madre" de tres perlas y mezclas de ligador. Tras la incubación, se leyeron las muestras tal como anteriormente y los resultados se resumen en la tabla 2. A partir del promedio corregido de las lecturas, se cuantificaron las mezclas de ligador mediante referencia a las curvas patrón. Los valores cuantificados, entre paréntesis, se muestran también en la tabla 2 y pueden compararse con las concentraciones conocidas de los ligadores mixtos mostrados en la primera columna.

Tabla 1

15 Datos sin procesar del lector (cada muestra se leyó tres veces y se calculó su promedio)

Conc. de ligador	Ligador CL-1 para pares de perlas de 675 nm				Ligador SP-1 para pares de perlas de 780 nm			
	Láser de 675 nm	Ligador 0 corregido	Láser de 780 nm	Ligador 0 corregido	láser de 675 nm	Ligador 0 corregido	Láser de 780 nm	Ligador 0 corregido
100 pM	74833		1718		418		79066	
	73360		1756		367		78564	
	78526		1773		322		74926	
promedio	75573	75268	1749	850	369	31	77519	76516
50 pM	42372		1386		390		44468	
	39892		1368		286		40955	
	42314		1385		309		38602	
promedio	41526	41221	1380	481	328	0	41342	40339
10 pM	9135		1042		437		8148	
	8667		968		310		7173	
	9088		1003		289		6364	
promedio	8963	8658	1004	105	345	7	7228	6225
5 pM	4383		1078		350		4210	
	4154		983		285		3813	
promedio	4310	4005	1013	114	285	0	3786	2783
1 pM	1228		981		410		1691	
	1152		905		347		1556	
	1089		896		335		1395	
promedio	1156	851	927	28	364	26	1547	544
0,5 pM	863		1285		366		1312	
	828		1254		256		1247	
	758		1191		254		1148	
promedio	816	511	1243	344	292	0	1236	233
0,0 pM	359		917		408		1051	
	263		890		269		990	
	294		890		336		967	
promedio	305	0	899	0	338	0	1003	0
aire	92		786		92		786	
	96		780		96		780	
	96		768		96		768	
promedio	95		778		95		778	

Tabla 2

Datos sin procesar de mezclas de ligadores variables (cada muestra se leyó tres veces y se calculó su promedio)

5

Razón CL-1/SP-1	Láser de 675 nm	Ligador 0 corregido		Láser de 780 nm	Ligador 0 corregido	
50/50 pM	38116			41168		
	36851			39195		
	40186			36456		
promedio	38384			38940		(=49,3 pM)
		38079	(=49,3pM)		37937	
50/5 pM	44265			5194		
	42957			4637		
	46629			4111		
promedio	44617			4647		(=5,2 pM)
		44312	(=57,5 pM)		3644	(=48,3 pM)
5/50 pM	4404			40744		
	3919			38473		
	4197			35301		
promedio	4173			38173		
		3868	(=4,4pM)		37170	
5/5 pM	4346			4642		
	4024			3982		
	4231			3681		
promedio	4200			4102		(=4,5 pM)
		3895	(=4,4 pM)		3099	

Se obtuvieron los valores en (***cursiva en negrita***) a partir de las curvas patrón para el ensayo de ligador. Se empleó un único ligador.

10

Ejemplo 2

Ensayo según el esquema 2

15

Se sintetizaron ligadores y sondas de oligonucleótidos por Oligos Etc. En este ensayo, las sondas tenían secuencias complementarias de manera que un extremo de la sonda se unía a un oligonucleótido en una perla y el otro extremo se unía a un ligador. Los ligadores tienen un extremo que era común para las sondas y se unía a las perlas de agente quimioluminiscente. El otro extremo del ligador era específico para la sonda que se unía o bien al sensibilizador de ftalocianina o bien al sensibilizador de naftalocianina según el esquema 2 (figura 3). Las sondas estaban presentes en exceso con respecto al ligador pero eran menos abundantes que la cantidad total de oligonucleótidos complementarios en las perlas de manera que cada perla estaba decorada con varias sondas y no se dejó ninguna sonda libre en disolución. En presencia del ligador, las perlas decoradas con sondas se unían al ligador en un ensayo de tipo intercalado "sandwich" que generaba una señal en proporción directa a la concentración de ligador.

25

Protocolo 2:

<u>Mezcla madre</u>	<u>por ensayo</u>	<u>mezcla madre</u>
agua	37,372 µl	1,856 ml
10X IHBB	5 µl	250 µl
dopTAR-A ₂₄ (5 mg/ml)	0,50 µl	25 µl
Pc-(AGTA) ₆ (5 mg/ml)	0,25 µl	12,5 µl
Nc-(ATAG) ₆ (5 mg/ml)	0,25 µl	12,5 µl
sonda RL-3, 1 µM (se une dopTAR a ligadores SO y AL-1)	0,625 µl	31,25 µl
sonda RL-2, 1 µM (se une PS-(AGTA) ₆ a ligador SO)	0,625 µl	31,25 µl
sonda RF-3, 1 PM (se une NS-(ATAG) ₆ a ligador AL-1)	0,625 µl	31,25 µl

ES 2 370 232 T3

Disoluciones madre de trabajo de ligador SO: 1000, 500, 100, 50, 10, 5 y 0 pM en agua.

Disoluciones madre de trabajo de ligador AL-1: 1000, 500, 100, 50, 10, 5 y 0 pM en agua.

Se pusieron cuarenta y cinco (45) μl de mezcla madre en cada uno de varios tubos de PCR con tapa a presión. Se añadieron cinco (5) μl de disolución madre de trabajo de ligador y se cubrieron las mezclas con 20 μl de aceite mineral. Usando un ciclador de PCR, se incubó el material 2 min. a 95°C, 15 min. a 50°C y 90 min. a 37°C. Se leyó cada muestra una vez.

Ensayo:

Se prepararon curvas patrón para los ligadores SO y AL-1 usando el protocolo 2. Se preparó una mezcla madre que consistía tanto en sensibilizadores, un único agente quimioluminiscente como tres sondas en tampón IHBB. Se pusieron alícuotas (45 μl) de la mezcla madre en tubos de PCR seguido por una alícuota (5 μl) de patrón de ligador diluido en serie y aceite mineral (20 μl). Se establecieron muestras por duplicado para ambos ligadores. Tras la incubación, se leyeron las muestras con un lector láser doble. (Tabla 3). Se calcularon los promedios de las muestras por duplicado y se corrigieron los promedios restando la lectura obtenida cuando no estaba presente ningún ligador en la muestra. Se usaron entonces los promedios corregidos para construir curvas patrón para los ligadores (figura 4). De manera similar, se preparó un conjunto de muestras a partir de la "mezcla madre" y una mezcla de los dos ligadores. Tras la incubación, se leyeron las muestras como anteriormente y los resultados se resumen en la tabla 4. A partir del promedio corregido de las lecturas, se cuantificaron las mezclas de ligadores usando las curvas patrón de ligador. Los valores cuantificados, en paréntesis, se muestran también en la tabla 4 y pueden compararse con las concentraciones conocidas de los ligadores mezclados mostradas en la primera columna.

Tabla 3

Datos sin procesar del lector (promedio de muestras por duplicado)

Conc. de ligador, pM	Ligador SO para pares de perlas de 675 nm				Ligador AL-1 para pares de perlas de 780 nm			
	Láser de 675 nm	Ligador 0 corregido	Láser de 780 nm	Ligador 0 corregido	Láser de 675 nm	Ligador 0 corregido	Láser de 780 nm	Ligador 0 corregido
100 pM	357681		3368		3864		376232	
	358282		3152		4079		380424	
promedio	357982	356657	3260	1391	3972	2647	378328	376459
50 pM	180225		3317		2497		207210	
	182250		2137		2475		213618	
promedio	181238	179913	2727	858	2486	1161	210414	208545
10 pM	31082		1834		1327		29851	
	35822		2591		1388		32730	
promedio	33452	32127	2213	344	1358	33	31291	29422
5 pM	11560		1915		1253		15362	
	10227		1654		1415		17156	
promedio	10894	9569	1785	-84	1334	11	16259	14390
1 pM	3126		2252		1894		4997	
	2915		2221		1275		3822	
promedio	3021	1696	2237	368	1585	260	4410	2541
0,5 pM	2764		2548		1595		3388	
	2202		2551		1186		2659	
promedio	2483	1131	2550	681	1391	66	3024	1155
0,0 pM	1303		1749		1305		1998	
	1210		2094		1478		1634	
promedio	1257	0	1922	0	1392	0	1816	0
aire	179		885		179		976	
	191		948		169		941	
promedio	185		917		174		959	

Tabla 4

Datos sin procesar a partir de mezclas de ligadores variables (promedio de muestras por duplicado)

5

Razón SO/AL-1	Láser de 675 nm	Ligador 0 corregido		Láser de 780 nm	Ligador 0 corregido	
50/50 pM promedio	189721 195089 192405			207813 212006 209910		
		191080	(=53,8 pM)		208041	(=54,3 pM)
50/5 pM promedio	180290 179343 179817			12893 12991 12942		
		178492	(=50,3 pM)		11073	(=3,2 pM)
5/50 pM promedio	12179 12403 12291			204797 213823 209310		
		10966	(=3,8 pM)		207441	(=54,2 pM)
5/5 pM promedio	11629 10960 11295			12801 12491 12646		
		9970	(=3,5 pM)		10777	(= 3,1 pM)

Se obtuvieron los valores en (*cursiva en negrita*) a partir de las curvas patrón para el ensayo de ligador y sonda,

Ejemplo 3

10

Ensayo para CL-1 y HA-1

El protocolo para este ensayo era esencialmente el mismo que se describió para el ensayo del ejemplo 1 anterior. En resumen, se añadieron alícuotas (normalmente de 45 µl) de una mezcla madre que contenía 3,75 µg de cada una de las perlas de sensibilizador a tubos de PCR de 200 µl. Se añadió a la mezcla madre polinucleótido diana (5 µl) (CL-1, HA-1 o una combinación de los mismos) a concentraciones apropiadas. Entonces se añadieron veinte (20) µl de aceite mineral a cada tubo. Entonces se sometieron las mezclas en los tubos a ciclado térmico tal como sigue: 95°C durante 3 min., 50°C durante 15 min. y 37°C durante 120 min. Se iluminaron los tubos y se leyeron.

15

20

Tras la resta del fondo (sin polinucleótido diana en los tubos de reacción), se determinó el cruce de señales de cada ligador de oligonucleótido en el otro canal. Entonces se corrigieron las señales para eliminar el cruce de señales del otro canal. Se usó la señal corregida para representar gráficamente curvas patrón para los dos ligadores de oligonucleótido así como para determinar el efecto de la presencia de un ligador de oligonucleótido sobre la cuantificación del otro ligador (véanse la tabla 5 y la tabla 6). La tabla 5 muestra la concentración de CL-1 calculada en presencia de HA-1. La tabla 6 muestra la concentración de HA-1 calculada en presencia de CL-1.

25

Tabla 5

	<u>Entrada de HA-1 (pM)</u>				
<u>Entrada de CL-1 (pM)</u>	<u>0,05</u>	<u>0,25</u>	<u>2,50</u>	<u>25,00</u>	<u>100,00</u>
0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04
0,25	0,23	0,23	0,22	0,23	0,21
2,5	2,4	2,4	2,3		
25,0	24,4	24,3		23,8	
100	95,3	96,6			94,4

30

Tabla 6

Entrada de HA-1 (pM)	Entrada de CL-1 (pM)				
	0,05	0,25	2,50	25,00	100,00
0,05	0,04	0,03	0,04	0,05	0,05
0,25	0,24	0,24	0,24	0,24	0,25
2,5	2,5	2,4	2,4		
25,0	23,8	24,0		24,4	
100	99,7	101,3			95,5

Ejemplo 4

5

Amplificación y cuantificación de un ADN de *Mycobacterium tuberculosis*

Se llevaron a cabo la amplificación y detección de ADN diana genómico de *Mycobacterium tuberculosis* (M. tb) usando PCR y los reactivos para el sistema de producción de señales descrito anteriormente. Se realizó la detección con un compuesto quimioluminiscente y dos sensibilizadores.

Se obtuvo ADN diana genómico de *Mycobacterium tuberculosis* (M. tb) (n.º de registro de GenBank Y14045NID) de C. Green, SRI International, Menlo Park, CA. La región usada para la amplificación y detección estaba en la secuencia de inserción 6110 (IS6110) que está presente en múltiples copias por genoma de M. tb (~10 copias/genoma). Todos los cebadores de PCR incluyendo los usados para la generación del amplicón de control interno (CI) de 494 pb se muestran a continuación. Los números de secuencia son la secuencia IS6110. La secuencia específica de CI de 24 bases introducida en el amplicón de CI está subrayada.

Los cebadores directos fueron:

ZL-3 18 meros 2645-2662

5' CCGTCCCGCCGATCTCGT (SEQ ID NO:12)

LB-3 18 meros 2833-2850

5' CGATCGAGCAAGCCATCT 3' Tm 66,8 (SEQ ID NO:13)

Los cebadores para introducir la secuencia Q de 24 bases en la región IS6110 fueron:

LH-1

5' GACAGTGTAGATAGATGACAGTCGCATCGATCCGGTTCAGCG (SEQ ID NO:14)

LH-2

5' CGACTGTCATCTATCTACACTGTCGGTGGATAACGTCTTTCAC (SEQ ID NO:15)

Los cebadores inversos fueron:

ZL-4 20 meros 2952-2971

5' GACGGTTGGATGCCTGCCTC (SEQ ID NO:16)

LH-4 22 meros 3117-3138

5' ACTGGTAGAGGCGGCGATGGTT (SEQ ID NO:17)

Se construyó el amplicón de control interno (CI) para M.tb IS6110 tal como sigue. Se introdujo la secuencia interna de 24 bases usando procedimientos de PCR convencionales. Los cebadores externos usados fueron ZL-3 y LH-4. Los cebadores internos LH-1 y LH-2 usados para la sustitución de la secuencia de TN de 24 bases por las secuencias de CI de 24 bases se muestran a continuación.

Se prepararon amplicones de PCR usando los pares de cebadores ZL-3 y LH-2 y se generó un segundo amplicón usando LH-1 y LH-4. Los amplicones esperados tuvieron 278 y 240 pares de bases, respectivamente. Entonces se hibridaron los dos amplicones generados, se extendieron y volvieron a amplificarse usando los cebadores externos ZL-3 y LH-4. Se procesó el producto de amplificación en un gel de agarosa al 1,5% y se cortó el amplicón de 494 pb

del gel. Se volvió a amplificarse el amplicón de CI con los cebadores externos ZL-3 y LH-4 y se purificó en gel del producto de 494 pb. Finalmente, se produjo el amplicón de CI mediante amplificación por PCR cuantificada usando electroforesis en gel y patrones de ADNbc conocidos. Se cuantificó también el amplicón de CI usando dilución límite de la diana seguido por amplificación por PCR. Se purificó el amplicón de CI usando un aparato Microcon-100 (Amicon Inc., Beverly, Massachusetts) para eliminar los nucleótidos y cebadores no incorporados; se almacenaron alícuotas congeladas a -20°C.

Se usaron las siguientes sondas para la detección:

10 La sonda común fue:

ZL-5 20 meros 2869-2887

15 5'(T)₂₀ GCGTACTCGACCTGAAAGAC (SEQ ID NO:18)

Esta sonda se une a la secuencia común presente en las dianas tanto de CI como de TN así como a la secuencia (A)₂₄ común en partículas marcadas. En el ensayo, la sonda se une a la secuencia (A)₂₄ en la partícula de agente quimioluminiscente DopTAR única (DopTAR-(A)₂₄).

20 La sonda específica de TN fue:

ZN-1 20 meros 2901-2920

25 5' ACGGATAGGGGATCTCAGTA (TACT)₅ (SEQ ID NO:19)

Esta sonda se une a la secuencia específica de TN y también a una partícula de sensibilizador de ftalocianina (Pc-(AGTA)₆) mediante la cola de la sonda (TACT)₅.

30 La sonda específica de CI fue:

CI 24 meros 2901-2920 en amplicón de CI sólo.

5' GACAGTGTAGATAGATGACAGTCG (CTAT)₅ (SEQ ID NO:20)

35 Esta es una sonda específica de CI y se une a la secuencia modificada por ingeniería genética de 24 bases presente en el amplicón de CI. En el ensayo, esta sonda también se une a la partícula de sensibilizador de naftalocianina (Nc-(ATAG)₆) mediante la cola de (CTAT)₅ presente en la sonda.

40 Todos los oligonucleótidos se sintetizaron por Oligos Etc. Además, todas las secuencias de sondas estaban bloqueadas en 3'-amino según procedimientos conocidos y se purificaron en gel para impedir la participación de la sonda durante la amplificación por PCR.

45 Se amplificó el ADN de CI y diana de M.tb mediante PCR usando el siguiente protocolo. En el ensayo que usa dos sensibilizadores, la mezcla de reacción consistía en trifosfato de nucleótidos 200 µM (dNTP) (Pharmacia Biotech.), cebadores LB-3 y ZL-4 250 nM, 5 unidades de cPfu (Stratagene), 25 nM de cada una de las sondas ZL-5, ZN-1 y CI, 3,75 µg de partícula de agente quimioluminiscente común (DopTAR-(A)₂₄) y 2,5 µg de cada una de las partículas de sensibilizador específicas (Pc-(AGTA)₆ y Nc-(ATAG)₆) en una reacción de 50 µl. Se llevó a cabo la reacción en un tampón que consistía en Tris-HCL 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, BSA acetilada 0,2 mg/ml (Gibco BRL). Finalmente, tras la adición de la diana, se añadieron 20 µl de aceite mineral a cada una reacciones. Se realizó el ciclado térmico de PCR tal como sigue: desnaturalización inicial a 95°C (3 min.), {95°C (20 s.), 63°C (1 min.), 73°C (1 min.)} x 36 ciclos, seguido por 75°C (5 min.). Inmediatamente tras la amplificación por PCR, se desnaturalizó el amplicón bicatenario a 95°C (2 min.), se hibridaron las sondas con la diana a 50°C (15 min.). Entonces, se dejó que las sondas se uniesen a las partículas de marcador a 37°C durante 60 minutos.

55 Se amplificó una serie de cantidades conocidas de ADN diana de M.tb en presencia de una cantidad constante de ADN de CI añadida a la muestra. La amplificación de la diana de M.tb y la diana de CI con los cebadores LB-3 y ZL-4 da como resultado un amplicón de 139 pb. La sonda común ZL-5 se une tanto a Mt.b de TN así como amplicones de CI por un lado como a la partícula quimioluminiscente mediante la cola de la sonda. Sin embargo, la sonda específica ZN-1 se une al amplicón de TH y a la partícula de ftalocianina (Pc) mientras que la sonda de CI se une específicamente al amplicón de CI y a la partícula de naftalocianina (Nc). Tras llevar a cabo la amplificación e hibridación de los reactivos con los amplicones generados, se leyó la señal quimioluminiscente generada por los pares de partículas formados con un lector tal como se mencionó anteriormente. Se obtuvo la señal de TN (Pc) iluminando los tubos con un láser de 675 nm durante 1,0 segundos seguido por lectura de la señal quimioluminiscente durante 1 segundo. A esto le siguieron 10 segundo de retardo para dejar que toda la señal de agente quimioluminiscente del primer par de partículas se descompusiera completamente. Se leyó la señal de CI (Nc) 6 veces con una iluminación de un segundo y una lectura de un segundo con un láser de 780 nm. Se restó la

señal de fondo (sin diana) de las lecturas. Tras eliminar la señal de interferencia, se obtuvo la señal corregida y se muestra en la tabla 7 (a continuación).

5

Tabla 7

Genomas de M.tb (entrada de TN)	CI	Señal corregida* de TN (Pc)(RLU)	Señal corregida** de CI (Nc)(RLU)	Genomas de TN derivados (TN C)
1,2E+01	0	1160470	1477	
4,00E+03	0	1260836	-1605	
0	1,20E+02	-56	1143140	
0	4,00E+04	61	1263188	
5,00E+01	2,00E+04	232015	1136556	45
5,00E+01	2,00E+04	203468	1113000	39
2,00E+02	2,00E+04	673804	949025	315
2,00E+02	2,00E+04	661124	906437	331
2,00E+02	2,00E+04	652938	893193	332
2,00E+03	2,00E+04	941123	632355	1392
2,00E+03	2,00E+04	917323	640118	1282
2,00E+03	2,00E+04	938149	651096	1297
2,00E+04	2,00E+04	1130373	264144	17847
2,00E+04	2,00E+04	1149292	273789	16973
5,00E+04	2,00E+04	1161752	178213	54901
5,00E+04	2,00E+04	1154424	163623	68142

* Señal de Pc corregida (TN) = [S-B_{Pc} menos (S-B_{Nc} x 0,0022)] en la que S-B es el fondo de la señal. El factor de corrección 0,0022 refleja el 0,22% de señal de cruce de Nc en el canal de la señal de Pc.

10 ** Señal de Nc corregida (CI) = [S-B_{Nc} menos (S-B_{Pc} x 0,0047)] en la que S-B es el fondo de la señal. El factor de corrección 0,0047 refleja el 0,47% de señal de cruce de Pc en el canal de la señal de Nc.

15 Se representó gráficamente el log de TN derivado (log de TN C) frente al log de genomas de M. tb añadidos por reacción (log de entrada de TN). Se derivó log TN C de la fórmula: $\text{Log (TN C)} = v(\log(\text{CI}/(\text{TN}+\text{CI}))+w+\log(\text{TN}/(\text{TN}+\text{CI}))$ en la que TN y CI son señales corregidas de cada perla, v idealmente tiene un valor de -1 y w idealmente tiene un valor de log(dianas de CI/por reacción). Sin embargo, se derivaron los valores de v y w a partir de un ajuste a una curva patrón para la combinación específica de sondas, sensibilizador y reactivos quimioluminiscentes y condiciones de ensayo. Los resultados se muestran en la figura 5.

20 La discusión anterior incluye ciertas teorías con respecto a mecanismos implicados en la presente invención. No debe interpretarse que estas teorías como que limitan la presente invención de ningún modo, puesto que se ha demostrado que la presente invención logra los resultados descritos.

25 Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad y comprensión, será obvio que pueden ponerse en práctica ciertos cambios o modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la presencia o las cantidades relativas de más de dos analitos diferentes que se sospecha que están en un medio, comprendiendo dicho método:
- 5
- a) proporcionar en combinación (1) un medio que se sospecha que contiene dichos más de dos analitos diferentes, (2) al menos dos reactivos sensibilizadores, pudiendo dichos reactivos sensibilizadores generar oxígeno singlete y pudiendo distinguirse entre sí mediante longitud de onda de sensibilización, y (3) múltiples reactivos que son reactivos que son composiciones quimioluminiscentes y que pueden activarse mediante oxígeno singlete y que pueden detectarse diferencialmente mediante diferentes longitudes de onda de emisión o mediante diferentes razones de descomposición y que están asociados con un miembro sbp que puede unirse con un analito, en el que un primer miembro de par de unión específica (sbp) está asociado con cada uno de dichos reactivos sensibilizadores y en los que, para cada uno de dichos reactivos sensibilizadores, dicho primer miembro sbp puede unirse a un analito respectivo o a un segundo miembro sbp para formar un complejo relacionado con la cantidad de dicho analito, y
- 10
- b) activar diferencialmente dichos reactivos sensibilizadores y detectar la cantidad de señal generada como resultado de la activación de cada uno de dichos reactivos que son reactivos, estando relacionada la cantidad de la misma con la cantidad de cada uno de dichos diferentes analitos en dicho medio.
- 20
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho segundo miembro sbp puede unirse con dicho analito.
3. Método según la reivindicación 1, en el que al menos uno de dichos reactivos que son reactivos comprende un aceptor de energía fluorescente.
- 25
4. Método según la reivindicación 1, en el que al menos uno de dichos reactivos que son reactivos es un precursor de indicador fotoactivo que se activa mediante oxígeno singlete para formar un indicador fotoactivo.
- 30
5. Método según la reivindicación 1, en el que dicha activación diferencialmente comprende irradiar dicho medio con luz de diferentes longitudes de onda.
6. Método según la reivindicación 1, en el que al menos uno de dichos sensibilizadores es un fotosensibilizador.
- 35
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicho fotosensibilizador es un colorante.
8. Método según la reivindicación 1, en el que al menos uno de dichos reactivos que son reactivos o dichos reactivos sensibilizadores está asociado con una partícula.
- 40
9. Método homogéneo según la reivindicación 8 para determinar la presencia o las cantidades relativas de más de dos analitos diferentes que se sospecha que están en un medio, comprendiendo dicho método:
- 45
- a) proporcionar en combinación (1) un medio que se sospecha que contiene dichos más de dos analitos, (2) un fotosensibilizador para cada uno de dichos analitos, estando cada uno de dichos fotosensibilizadores asociado con una primera partícula y generando oxígeno singlete y teniendo una longitud de onda de sensibilización diferente entre sí, y (3) composiciones quimioluminiscentes que pueden activarse mediante oxígeno singlete, asociándose cada uno de éstas con una segunda partícula, en el que dichas composiciones quimioluminiscentes pueden detectarse diferencialmente mediante diferentes longitudes de onda de emisión o mediante diferentes razones de descomposición y en el que las diferentes longitudes de onda de sensibilización y las diferentes longitudes de onda de emisión o diferentes razones de descomposición dan como resultado la detección diferencial de cada uno de dichos analitos y en el que cada uno de dichos fotosensibilizadores está asociado con un primer miembro de par de unión específica (sbp) y en el que, para cada uno de dichos fotosensibilizadores, dicho primer miembro sbp puede unirse a un analito respectivo o a un segundo miembro sbp para formar un complejo relacionado con la cantidad de dicho analito, e
- 50
- b) irradiar diferencialmente cada uno de dichos fotosensibilizadores con luz y detectar la cantidad de luminiscencia generada por cada una de dichas composiciones quimioluminiscentes en un tiempo tras la activación y a una longitud de onda que corresponde a la razón de descomposición y longitud de onda de dicha emisión luminiscente, estando relacionada la cantidad de la misma con la cantidad de cada uno de dichos diferentes analitos en dicho medio.
- 60
10. Método según la reivindicación 9, en el que al menos uno de dichos fotosensibilizadores es un colorante.
- 65

11. Método según la reivindicación 9, en el que al menos uno de dichos fotosensibilizadores se selecciona del grupo que consiste en naftocianinas, ftalocianinas, tiazinas, porfirinas, metaloporfirinas, oxazinas, cianinas, escuarainas, xantenos, merocianinas.

5 12. Método según la reivindicación 9, en el que al menos una de dichas composiciones quimioluminiscentes es un compuesto olefínico.

10 13. Método según la reivindicación 12, en el que dicho compuesto olefínico se selecciona del grupo que consiste en tioxenos, dihidrooxazinas y dioxenos.

14. Método según la reivindicación 9, en el que dichas partículas primera y segunda se seleccionan independientemente del grupo que consiste en partículas de látex, liposomas y gotitas de aceite.

15 15. Método según la reivindicación 9, en el que dichos analitos se seleccionan del grupo que consiste en ligandos, receptores y polinucleótidos.

FIG. 1

**Esquema 1
Ensayo de ligador**

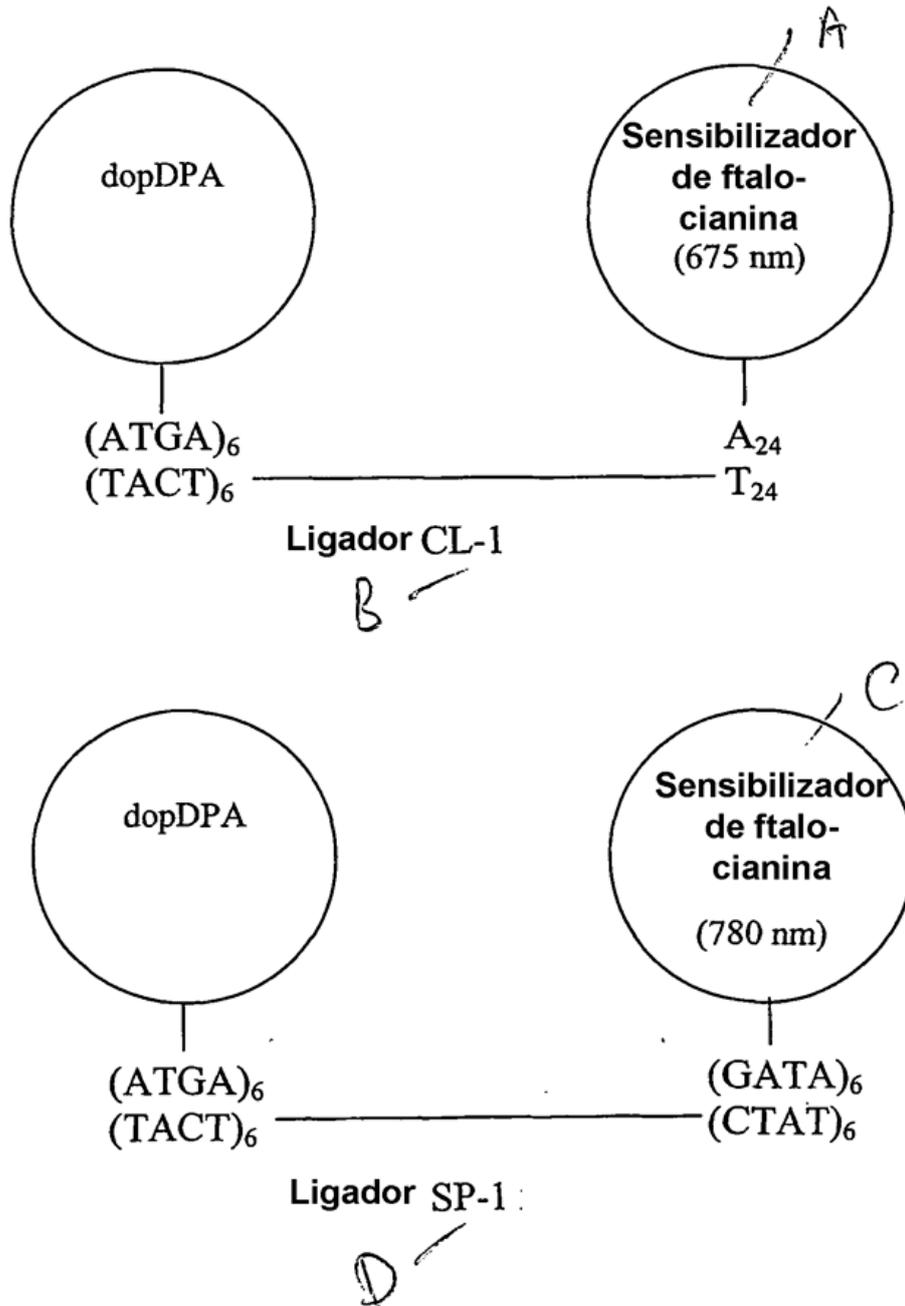


FIG. 2

Curvas patrón de CL-1 y PS-1 (volumen de ensayo de 50 ul)

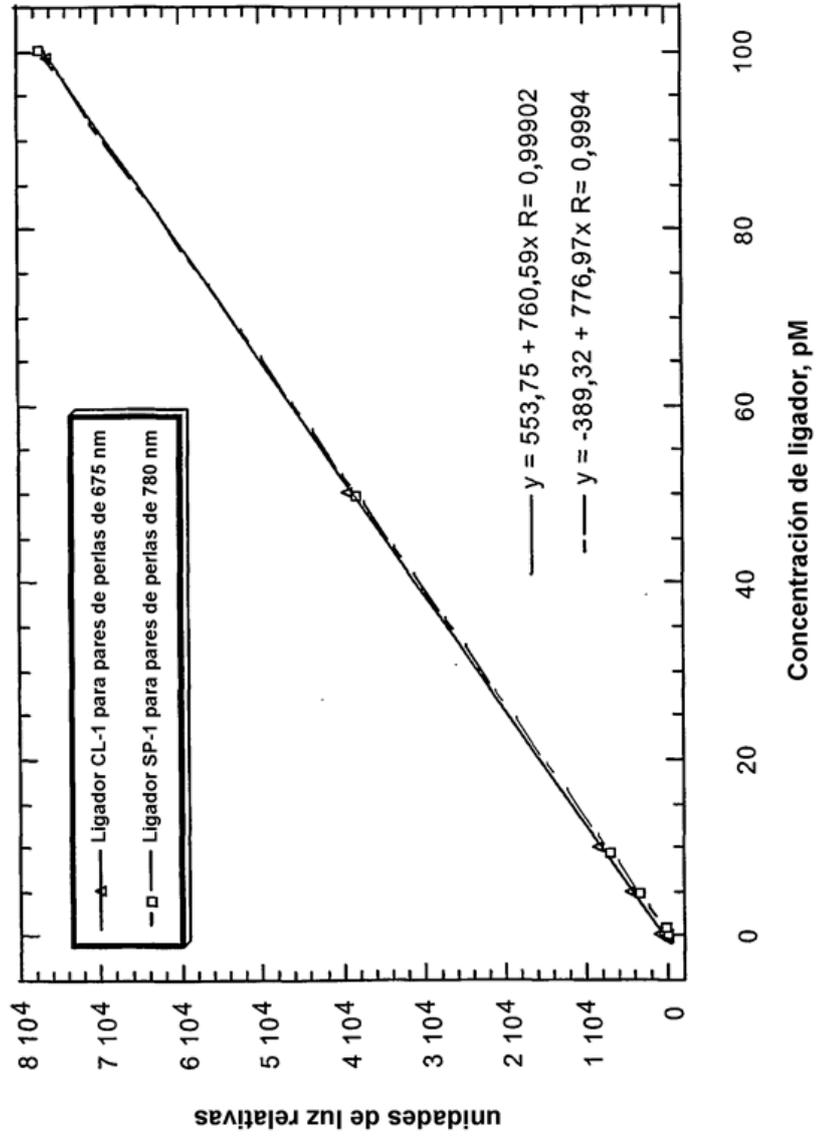


FIG. 3

Esquema 2
Ensayo de ligador y sonda

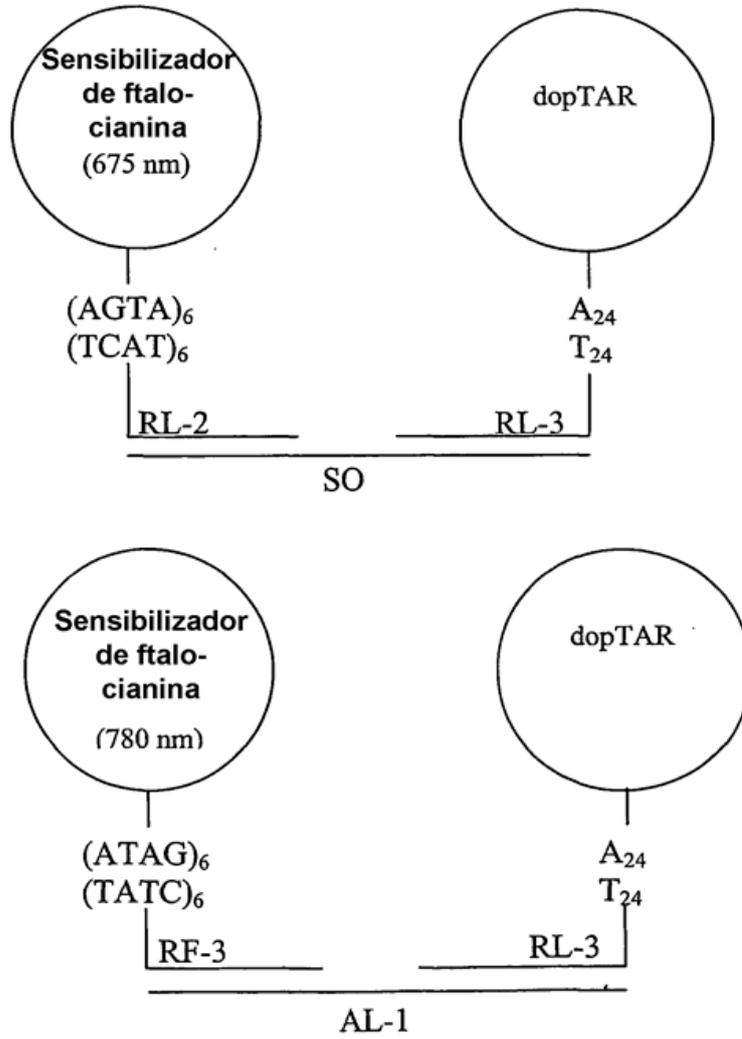


FIG. 4

Curvas patrón de SO y AL-1 (volumen de ensayo de 50 ul)

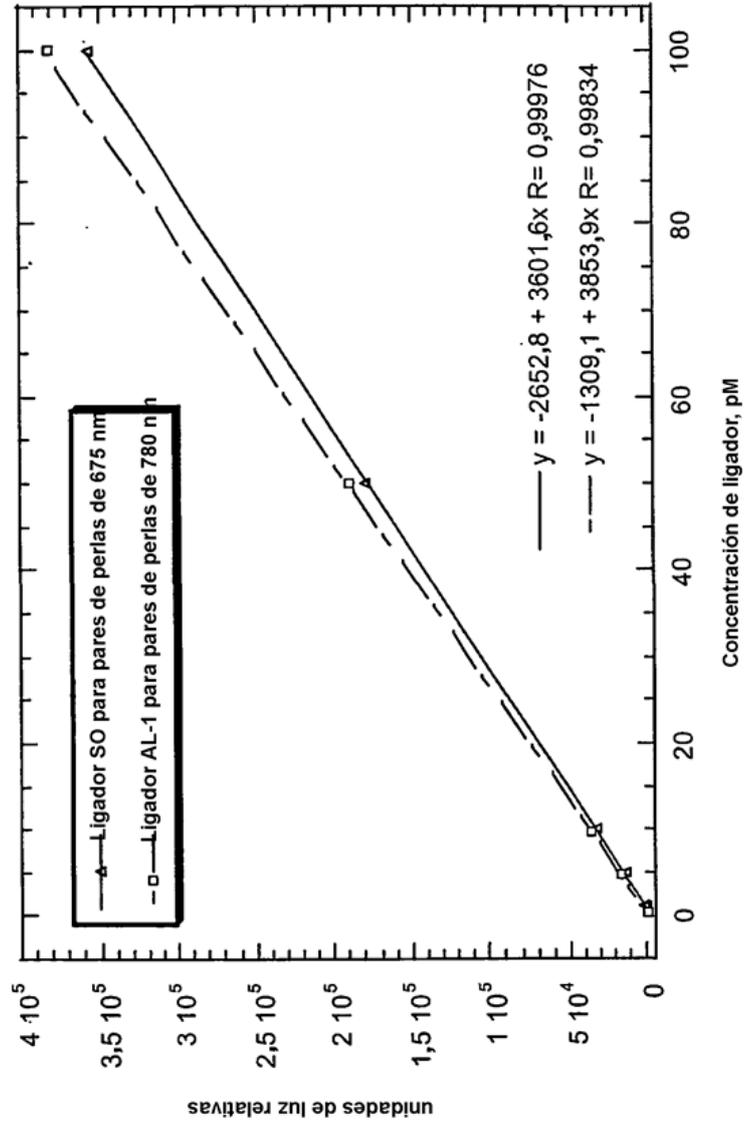


FIG. 5

