

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 083**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04811364 .1**
96 Fecha de presentación: **10.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1702076**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2006**

54 Título: **Método y composición para estabilizar reactivos líquidos**

30 Prioridad:
24.11.2003 US 720909

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2012

73 Titular/es:
**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
1717 DEERFIELD ROAD
DEERFIELD, IL 60015, US**

72 Inventor/es:
**JANZEN, Roland y
SCHELP, Carsten Ulrich**

74 Agente/Representante:
Zuazo Araluze, Alexander

ES 2 379 083 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y composición para estabilizar reactivos líquidos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para estabilizar reactivos líquidos atrapando especies de unión libres en una disolución o suspensión de reactivo. En particular, la presente invención proporciona un método para inmovilizar especies de unión libres en una disolución de reactivo usando un sustrato de unión que tiene selectividad para la unión a la especie de interés.

Antecedentes de la invención

En diagnósticos clínicos *in vitro* modernos, se usa una variedad de métodos para la detección de analitos en una muestra. En una forma de un método de diagnóstico, un inmunoensayo, se usan una o más especies de unión específica. Ejemplos típicos son el inmunoensayo de tipo sándwich, en el que dos especies de unión específica (anticuerpo o antígeno) se unen al analito de interés, y el inmunoensayo de competición, en el que el analito de interés y un análogo de este analito compiten por la unión a una especie de unión específica. Una de las especies de unión específica se fija comúnmente a un denominado marcador o etiqueta, que puede ser un átomo (por ejemplo, radioactivo), molécula (por ejemplo, un compuesto enzimático, fluorescente o luminiscente) o partícula (magnética o látex). Este marcador permite la detección del analito de interés mediante una variedad de métodos de detección correspondientes al marcador usado. En un ensayo de competición, o bien la especie de unión específica o bien el análogo de analito pueden llevar el marcador.

La otra especie de unión específica está con frecuencia asociada a un sustrato sólido o que puede ponerse en suspensión ("la fase sólida") de manera covalente o mediante adsorción. Alternativamente, puede conectarse a un primer miembro de una segunda pareja de unión (por ejemplo, biotina), mientras que el segundo miembro de la segunda pareja de unión (por ejemplo, estreptavidina) se fija a la fase sólida. Esto permite que la especie de unión específica se una a la fase sólida mediante la interacción de la segunda pareja de unión (por ejemplo, biotina-estreptavidina).

Las fases sólidas pueden ser fases sólidas macroscópicas, tales como pocillo de microtitulación, dispositivos de tubo y bola en tubo, o fases sólidas que pueden ponerse en suspensión, tales como perlas, perlas de látex, perlas de látex magnéticas, así como otros materiales paramagnéticos. Habitualmente se marca una especie de unión secundaria mediante el uso de una etiqueta. La interacción entre la etiqueta y la fase sólida permite la detección y cuantificación del analito de interés mediante una variedad de métodos de detección correspondientes al marcador usado.

Es importante para la estabilidad y reproducibilidad del ensayo de diagnóstico que la capacidad de unión de la especie unida a la fase sólida por su pareja de unión no resulte afectada a lo largo del tiempo. Esto puede dar como resultado una disminución de la capacidad de reacción y disminución de la sensibilidad del ensayo. Un mecanismo que puede conducir a una alteración de este tipo (aparente como inestabilidad) es el escape de una parte de la especie fijada a la fase sólida al medio circundante. La especie libre compite con la especie fijada a la fase sólida por la unión a la diana y habitualmente tiene una ventaja cinética significativa debido a su difusión más rápida. Por tanto, resulta ventajoso mantener constante la cantidad de especie libre que compite con la especie fijada a la fase sólida en un reactivo, preferiblemente muy próxima a cero. Esto permitirá la detección sensible de analitos de una manera estable y reproducible. La manera preferida de eliminar especies libres es hallar un método de unión que elimine la disociación. La unión covalente, al contrario que la asociación por adsorción, puede ser el método de elección, debido a su mayor fuerza de unión. Sin embargo, en muchos casos esto puede ser imposible o no ser práctico por diversos motivos.

Por ejemplo, el material elegido para la fase sólida puede carecer de grupos activos adecuados para el acoplamiento covalente. Si es el caso, debido al tipo de ensayo, o por consideraciones de coste, entonces la adsorción será la elección preferida de asociación. Un método alternativo implica tener una especie de unión que está fijada al material de fase sólida indirectamente mediante una especie de unión auxiliar. Un ejemplo de esto sería un antígeno o anticuerpo biotinilado que se fija a un sustrato recubierto con avidina, siendo la avidina la especie auxiliar. La propia especie de unión auxiliar puede estar asociada con la fase sólida mediante un enlace covalente o mediante adsorción. Este método puede usarse cuando la especie de unión se inactiva si se asocia directamente con el material de fase sólida. De nuevo, dado que la constante de afinidad de la especie de unión auxiliar no es infinita, puede producirse algo de disociación, en forma de escape.

Un método adicional incluye especies de unión que consisten en subunidades que o bien están asociadas de manera no covalente entre sí o bien tienen un enlace covalente que es reversible en condiciones de almacenamiento normales. Las subunidades que están fijadas de esta manera reversible e indirectamente a la fase sólida pueden disociarse de la(s) subunidad(es) acoplada(s) a la superficie. Si la subunidad libre conserva su capacidad de unión en el ensayo, o la recupera tras combinarse con otras subunidades libres, la subunidad libre

puede interferir en el ensayo.

Si no puede eliminarse el escape, se han empleado varias prácticas, cada una con sus desventajas particulares, para compensar el escape, incluyendo las siguientes:

5 1) Recalibración frecuente para corregir la desviación provocada por el escape de la especie de unión. La desventaja más obvia es el coste adicional por el reactivo y el tiempo empleados en la recalibración. El escape también puede limitar la vida útil de almacenamiento debido a que las señales de ensayo disminuyen hasta niveles insuficientes.

10 2) Suministrar los inmunoensayos y otros reactivos de ensayo de diagnóstico en una forma seca, tal como producto liofilizado o secado al aire. Este enfoque elimina habitualmente el escape, pero normalmente se necesita reconstituir los reactivos secos mediante adición de líquido, lo que requiere tiempo y esfuerzo por parte de un usuario. El propio procedimiento de secado requiere procesamiento adicional por parte del fabricante e introduce una fuente de falta de homogeneidad y variación entre botellas no encontrada en reactivos en una forma líquida. El procedimiento de secado también puede aumentar la variación entre lotes.

15 3) Si la fase sólida es estacionaria (por ejemplo placa de microtitulación) o puede separarse convenientemente del líquido (perlas magnéticas u otras perlas de mayor o menor tamaño), es posible "lavar" el reactivo con agua o un líquido apropiado antes de comenzar el ensayo. Una desventaja de este enfoque implica el tiempo, esfuerzo y materiales adicionales requeridos para una etapa de "lavado previo" y los límites impuestos sobre la flexibilidad en el diseño de la secuencia de ensayo.

20 La patente estadounidense número 5.212.063 da a conocer una trampa de ligando útil para reducir o eliminar la interferencia de biotina en inmunoensayos que emplean anticuerpos marcados con biotina (u otra especie biotinilada). La biotina, que se produce de manera natural en fluidos corporales, puede competir con la especie biotinilada por sitios de unión en el conjugado de avidina o estreptavidina empleado en estos ensayos y provocar resultados erróneos. La biotina se elimina selectivamente de la reacción inmunológica incubando la disolución de muestra con partículas poliméricas consistentes en un núcleo modificado con estreptavidina y un recubrimiento biopolimérico.

25 La patente estadounidense número 5.863.740 da a conocer un agente de eliminación de interferencias mediante la modificación e inactivación de moléculas de estreptavidina mediante saturación con biotina, modificación química o ingeniería genética.

30 La patente estadounidense número 4.256.834 da a conocer un inmunoensayo de partículas eliminadoras fluorescentes. Un reactivo empleado en la reacción contiene un represor de señales. Este represor de señales interacciona con un marcador conectado a un elemento de un sistema de producción de señales en disolución a granel. Tras acoplar el marcador y el elemento del sistema de producción de señales al elemento homólogo del sistema de generación de señales, el represor de señales ya no interfiere.

35 El documento WO95/22766 A se refiere a un analito en una muestra de paciente que se une de manera no específica a la fase sólida. En el documento WO95/22766 A la muestra se mueve rápidamente sobre la superficie de la fase sólida.

40 El documento US-A-5 705 338 enseña un puente reversible de modo que determinados componentes permanecen unidos hasta que se necesita. En el momento en el que se necesitan los componentes se altera el puente.

45 En el documento US-A-6 406 913 se fijan dos anticuerpos a una fase sólida. Sin embargo, estos anticuerpos no reaccionan entre sí. En vez de eso, ambos reaccionan con el mismo analito para formar un sándwich. Ambos participan en la reacción que es necesaria para que el ensayo funcione.

50 Si la fijación de la especie de unión a su fase sólida no es irreversible, y los posibles remedios comentados anteriormente no son una opción, se liberará una determinada cantidad de la especie de unión al medio fluido. Esto puede conducir a una alteración del ensayo, demostrada normalmente como inestabilidad.

55 La situación se agrava adicionalmente porque la producción de reactivos se produce normalmente una cantidad significativa de tiempo antes de su uso real. Esto crea la necesidad de almacenar los reactivos de ensayo en una variedad de condiciones. Durante el almacenamiento y transporte, puede haber irregularidades de temperatura, lo que puede afectar perjudicialmente a la liberación de la especie unida a la fase sólida. Todas estas variables de tiempo, temperatura y movimiento contribuyen a la disociación de la especie de unión del material de fase sólida.

60 Aunque la disociación tendrá lugar principalmente antes de usar los reactivos de ensayo, la alteración resultará cuando se añada una muestra, tal como un fluido corporal. Esta especie disociada competirá entonces con la especie fijada a la fase sólida para la unión a la diana y habitualmente tiene una ventaja cinética significativa debido a su tasa de difusión más rápida. Cuando la cantidad de diana es limitada, incluso una cantidad pequeña de material

libre puede reducir significativamente el número de dianas unidas a la fase sólida. Esto, a su vez, puede proporcionar resultados falsos que, incluso cuando se detectan, requerirán nuevas series y recalibración.

5 Por tanto es altamente deseable mantener constante la cantidad de especie libre en los reactivos, preferiblemente muy próxima a cero. Cuando la asociación permanente de la especie de unión a la fase sólida es físicamente imposible o económicamente prohibitiva, debe proporcionarse un remedio para evitar la inestabilidad que puede dar como resultado resultados de pruebas incorrectos.

10 Sumario de la invención

10 La presente invención ofrece una solución proporcionando un método para mejorar la fiabilidad y sensibilidad de ensayos. Esta solución se logra estabilizando reactivos de ensayo inmovilizando una especie disociada de una disolución de medio fluido durante y tras el desprendimiento de la especie de una fase sólida, permitiendo así que la concentración de especie libre permanezca próxima a cero. Esto se logra usando un sustrato, tal como una fase
15 sólida de eliminación, que tiene fijada una pareja o parejas de unión ("eliminador") para la especie de unión específica está presente en el reactivo durante el almacenamiento. Este sustrato se une a cualquier especie libre que se escape de la fase sólida e impide que tal especie interfiera con el ensayo.

20 Descripción detallada de la invención

20 Es esencial que el sustrato de eliminación de la presente invención cumpla varios criterios, incluyendo, pero sin limitarse a:

25 1) si el material elegido es poroso, los poros deben ser lo bastante grandes para permitir que la especie libre se difunda al interior del sistema de poros, en el que la captura el sustrato eliminador.

30 2) si la fase sólida es un material que puede ponerse en suspensión, el sustrato eliminador debe permitir la retención de la especie libre, sin fijarse al material de fase sólida que puede ponerse en suspensión de una manera que afecte de manera perjudicial a la intensidad de señal o la unión de la diana de unión a la especie unida a la fase sólida.

3) El número y la afinidad de eliminadores en el sustrato eliminador debe ser suficiente para capturar y retener especies de unión libres que pueden escaparse de la fase sólida durante la vida útil de almacenamiento del producto.

35 4) El sustrato eliminador no debe interferir con un procedimiento de pipeteado. Por tanto, o bien está conectado al recipiente de almacenamiento de reactivo, se separa antes del pipeteado (incluyendo deposición mediante sedimentación) o bien es de un tamaño lo bastante pequeño como para pasar a través del dispositivo de pipeteado.

40 5) Si el sustrato eliminador se pipetea con el reactivo que va a estabilizarse, el sustrato eliminador no debe interferir con las reacciones que son parte del ensayo; es decir, aparte de los eliminadores fijados, el sustrato eliminador debe ser ampliamente inerte a todos los constituyentes relevantes del ensayo.

45 6) Además, si el sustrato eliminador se pipetea con el reactivo que estabiliza, el sustrato eliminador no debe interferir con el sistema de detección. En casos en los que el sustrato eliminador puede interferir con la detección, el sustrato debe poder eliminarse antes de la detección mediante métodos comunes tales como sedimentación, filtración o separación magnética.

50 7) El sustrato eliminador debe ser lo suficientemente estable para que cualquier cantidad de eliminador que se escapa del sustrato eliminador sea demasiado pequeña como para interferir con el ensayo.

55 En una realización de la presente invención, se proporciona un método y composición que puede mejorar la estabilidad de reactivos líquidos usados en inmunoensayos u otros métodos de diagnóstico *in vitro*. Proporciona medios para eliminar o neutralizar las especies de unión que se disocian mediante escape o lixiviación de una superficie u otra fase sólida usada en el dispositivo, que de otro modo pueden interferir con el ensayo. En un caso a modo de ejemplo, se aplicó la presente invención a reactivos de látex modificados con estreptavidina (SA), tal como se usan en un inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente (LOCI™). Perlas de látex teñidas e hidrófilamente recubiertas, modificadas covalentemente mediante acoplamiento (SA) en su superficie, son un reactivo genérico útil en inmunoensayos de LOCI™.

60 Se ha descubierto inesperadamente que muchas composiciones de reactivos liberan lentamente SA tras el almacenamiento en suspensión aunque no era posible detectar material físicamente adsorbido o la rotura de enlaces covalentes que unen la SA a las perlas así como a otros materiales, tales como SA sobre partículas de cromo con un recubrimiento hidrófilo o sobre látex con un núcleo magnético. Posiblemente la estructura de subunidad de SA permite la disociación de subunidades de SA unidas de manera no covalente de la superficie y la reasociación con SA intacta en la disolución. Dado que parece que el escape a partir de la superficie se debe a una propiedad inherente de SA, se esperará que la estabilización de las perlas sea difícil.

En un ejemplo, se añadió una pequeña cantidad de un sustrato poroso, modificado de manera covalente con biotina. Se eligió un material polimérico, tal como los usados para cromatografía de afinidad (Toyopearl AF-Amino-650M, lote 65NHM52W), con grupos funcionales amino (90 $\mu\text{mol/ml}$), un tamaño de poro de aproximadamente 100 nm (1000 Å), y un tamaño de partícula de aproximadamente 65 μm y se acopló de manera covalente biotina (sulfo-NHS-LC-biotina) a la superficie. La razón molar de grupos amino con respecto a derivado de biotina fue de aproximadamente 2 y el medio de acoplamiento fue bicarbonato de sodio 0,15 M. El material era lo suficientemente grande como para tener una superficie externa muy pequeña (<0,1 m^2/ml), lo que minimiza la posible adsorción de perlas de SA. Los poros son lo bastante grandes (aproximadamente 100 nm) como para permitir acceso para la molécula de SA (aproximadamente 5 nm), incluso después de que la estructura de poros se vuelva más estrecha debido a la modificación con biotina, proteína de bloqueo y saturación parcial con SA. Al mismo tiempo, los poros son lo suficientemente pequeños como para que el material tenga un gran área superficial interna (>50 m^2/g) y una capacidad de unión correspondientemente alta, minimizando así la cantidad de perlas eliminadoras requeridas. Los poros también son lo suficientemente pequeños como para excluir perlas de SA que tienen normalmente 200 nm o más.

Los parámetros elegidos para el sustrato eliminador representan un posible óptimo en cuanto a economía (si se desea usar la menor cantidad de eliminador posible para estabilizar el reactivo de inmunoensayo). Sin embargo, un sustrato eliminador con diferentes tamaños de partícula (desde < 100 nm hasta aproximadamente 5 mm), diferente tamaño de poro promedio (por ejemplo, entre 50 y 5000 Å), diferente tipo y densidad de grupos funcionales, también funcionará en circunstancias apropiadas.

En un ejemplo, se añadió sustrato eliminador acoplado a biotina, tal como perlas Toyopearl, a un reactivo de perlas de SA (con una concentración de 1400 μg de perlas/ml) a una concentración de aproximadamente 0,350 μl de volumen de perlas depositadas por ml de reactivo. Inicialmente se mezclaron las perlas mediante formación de vórtex y después se almacenaron en pocillos dentro de recipiente de reactivo Flex™, disponible de Dade Behring Inc., Deerfield, IL, sin agitación adicional. Las perlas eliminadoras se depositaron en el fondo de los pocillos y actuaron desde allí. Se preparó el reactivo de perlas de SA usando una perla Toyopearl (AF-Amino-650M, lote 65NHM52W) que tenía un tamaño de perla de 65 μm , un tamaño de poro de 300 Å, 90 $\mu\text{mol/ml}$ de grupos amino en la superficie (un producto de Tosoh Haas, disponible de Sigma) y biotina-LC-NHS (Sulfo) de Pierce.

Se siguió el siguiente procedimiento:

1. Añadir 1 ml de suspensión de perlas Toyopearl (aproximadamente 0,7 ml de perlas depositadas) en una columna con extremos tapados pequeña (columna amarilla con tapas para extremo ancho y estrecho).
2. Lavar las perlas con 15-20 ml de NaHCO_3 (0,15 M).
3. Añadir 1 ml de disolución de NaHCO_3 0,15 M y agitar con vórtex para resuspender las perlas.
4. Disolver 20 mg de biotina-LC-NHS (sulfo) en 1 ml de agua DI.
5. Añadir (4) en (3) con vórtex.
6. Girar la columna con extremos tapados a temperatura ambiente durante la noche (aproximadamente 24 h).
7. Añadir 50 mg de BSA a la disolución y girar la columna a temperatura ambiente durante la noche.
8. Lavar las perlas con 30 ml de tampón HEPES 50 mM, pH 7,5.
9. Añadir 2 ml de tampón HEPES para resuspender las perlas.

Los resultados del estudio de estabilidad (tablas 1 y 2) muestran que la liberación de SA a 4°C conduce a una disminución de la recuperación en un ensayo de TSH. Cuando se centrifugan (“se lavan”) las perlas de SA tras 35 días para eliminar la SA libre, se obtiene la cuantificación original. Por tanto, la SA es la causa de la aparente inestabilidad. En presencia de perlas eliminadoras, existe un ligero aumento inicial debido a la unión de las perlas eliminadoras a una pequeña cantidad de SA que está libre al comienzo del estudio. Tras ese periodo inicial, la recuperación permanece constante dado que las perlas eliminadoras mantienen la cantidad de SA libre próxima a cero.

En otra realización a modo de ejemplo, el sustrato eliminador comprendía un material no poroso, por ejemplo una superficie, modificada de una manera que la SA tiene acceso, pero las perlas modificadas no. También puede usarse un material que tiene hendiduras, tales como grietas y otro diseño sin patrón. Alternativamente, o junto con las otras texturas, pueden usarse ranuras para funcionar de una manera similar al sustrato poroso. Además, el sustrato puede tener una configuración de tipo cepillo, mediante lo cual la especie libre disociada puede migrar más allá de los apéndices de tipo cepillo y unirse al interior del sustrato. El material de fase sólida, debido a la diferencia de tamaño, no entrará en la zona de unión del sustrato de tipo cepillo.

Una realización adicional puede consistir en un sustrato no poroso que tiene la capacidad de unirse a la especie disociada, libre, debido a su peso, tasa de difusión y otras características de la molécula disociada, no aparentes en la especie unida a la fase sólida.

5 En una realización aún adicional, un sustrato puede tener múltiples sitios de unión para los miembros de la pareja de unión fijados a la fase sólida. Este sustrato puede presentar preferiblemente, aunque no necesariamente, las propiedades de eliminación de especie libre comentadas anteriormente. Los múltiples sitios de unión permiten que miembros de pareja de unión de una pluralidad de partículas de fase sólida se fijen a partículas de sustrato comunes. De esta manera, el sustrato permite la reticulación de los miembros de unión sobre la fase sólida. La reticulación crea una red de generación de señales que mejora la sensibilidad de ensayos y la relación señal a ruido formando agregados de partículas. Estos agregados de partículas conducen además a una amplificación de la señal del ensayo a través de las redes de generación de señal.

10 Tal como se comentó anteriormente, SA se escapa de reactivos modificados con SA durante el almacenamiento conduciendo a una disminución de la fiabilidad y sensibilidad del ensayo. Con el fin de solucionar este problema, se acopló biotina a perlas sensibilizadoras teñidas. En un ejemplo, se prepararon las perlas sensibilizadoras biotiniladas mediante el siguiente método: se activó el lote 1053:89 de perlas sensibilizadoras teñidas no recubiertas con EDAC seguido por NHS y después se hizo reaccionar con biotina LC-PEO-amina (+) trioxaundecanodiamina (Pierce 21347 lote DH57849) a TA durante 72 horas; el peso de perlas final es de 20 mg/ml; el tampón final es TRIS 100 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, BSA 1 mg/ml, Triton X 405 al 0,1%, Proclin 300 al 0,01%, pH 8,0.

15 Se añadieron las perlas modificadas con biotina al reactivo de SA a diferentes concentraciones. Se eligieron ensayos LOCI™ de TSH y FT3 como ensayos modelo. Las concentraciones de perlas de SA en los ensayos de TSH y FT3 fueron de 1400 µg/ml y 400 µg/ml, respectivamente. Se añadieron las perlas sensibilizadoras modificadas con biotina a concentraciones del 1% y el 5% (TSH: 14 µg/ml, 70 µg/ml; FT3: 4 µg/ml, 20 µg/ml) de la concentración de perlas de SA. Se incubaron las mezclas durante la noche a 4°C. Se midieron los calibradores de TSH y FT3 y se compararon usando las diferentes suspensiones de perlas sensibilizadoras en el inmunoensayo respectivo.

20 Los resultados (tablas 5 y 6) mostraron que, en presencia de las perlas sensibilizadoras modificadas con biotina, hubo un aumento sustancial en la señal de respuesta del inmunoensayo mientras que el ruido de fondo para TSH permaneció esencialmente inalterado. Esto indica la formación de redes de generación de señales además de la eliminación satisfactoria de especie libre. La intensidad de señal amplificada fue principalmente el resultado de las redes de generación de señales. La buena reproducibilidad de señales a lo largo del transcurso de un estudio de estabilidad fue principalmente el resultado de las propiedades de eliminación de las perlas sensibilizadoras modificadas con biotina.

25 Un segundo sustrato con propiedades de eliminación y/o reticulación, tal como se describió anteriormente, proporciona una solución casi universal para problemas de escape de compuestos que representan una parte de una pareja de unión específica. Proporciona una solución para ensayos en los que se usa un medio fluido junto con un primer sustrato que tiene una primera especie de unión que se separa en una primera parte y una segunda parte, siendo la segunda parte disociada la especie libre. Se usa un segundo sustrato, que tiene regiones adaptadas para unirse selectivamente a la segunda parte de la primera especie de unión (especie libre) de la disolución sin interferir con el ensayo. Preferiblemente, este segundo sustrato se reticula con el primer sustrato formando agregados para aumentar la intensidad de la señal. La adición del segundo sustrato pone muy pocas limitaciones sobre la naturaleza de la "fase sólida" y no requiere ninguna etapa de separación o lavado o liofilización. No existe necesidad de cortos periodos de calibración para corregir el efecto de especie libre y en muchos casos, la vida útil de almacenamiento del dispositivo puede ampliarse significativamente.

30 Tal como se describió anteriormente, la tabla 1 y la tabla 2 describen adicionalmente los resultados de un estudio de estabilidad de ensayo de TSH de 35 días. Tal como puede observarse a partir de la tabla 1, se midió la estabilidad del ensayo en ausencia de un sustrato eliminador. Se realizó la cuantificación el mismo día usando una curva generada con material almacenado a -70°C. Tal como puede observarse entre los niveles de calibración desde 2 hasta 5, los valores de analito indicados por el ensayo se degradan significativamente a lo largo del tiempo.

55 TABLA 1

Estabilidad de ensayo de TSH (almacenamiento a 4°C) en ausencia de eliminador poroso						
Cuantificación realizada el mismo día usando curva generada con material almacenado a -70°C.						
Calibrador	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 35	Día 35 (lavado)
Nivel 1	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	0,01
Nivel 2	0,87	0,80	0,71	0,69	0,65	0,89
Nivel 3	3,98	3,63	3,31	3,15	2,91	4,01
Nivel 4	19,39	18,01	16,84	15,31	14,52	19,66
Nivel 5	54,68	50,01	47,03	44,59	37,25	55,39

TABLA 2

Estabilidad de ensayo de TSH (almacenamiento a 4°C) en presencia de eliminador poroso					
Cuantificación realizada para cada día usando la misma curva de calibración que en la tabla 1					
Calibrador	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 35
Nivel 1	0,00	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02
Nivel 2	0,98	0,99	0,98	0,99	1,01
Nivel 3	4,34	4,51	4,53	4,40	4,62
Nivel 4	20,77	22,11	22,08	21,62	22,22
Nivel 5	58,62	61,49	62,56	58,90	62,39

5 Tal como se ilustra además por la tabla 3, en promedio la disminución de cuantificación entre los niveles de calibrador desde 2 hasta 5, según se mide desde el día 0, fue tal como sigue:

TABLA 3

Disminución de la estabilidad de ensayo de TSH para los niveles de calibrador 2-5 en ausencia de eliminador				
Calibrador	Día 7	Día 14	Día 21	Día 35
Nivel 2	0,920	0,816	0,793	0,747
Nivel 3	0,912	0,832	0,791	0,737
Nivel 4	0,929	0,868	0,790	0,749
Nivel 5	0,915	0,860	0,815	0,681
Promedio	0,919	0,844	0,797	0,729

10 En cambio, los niveles de disminución en presencia de un eliminador permanecieron a una constante próxima a cero, tal como se ilustra mediante la tabla 4.

TABLA 4

Disminución de la estabilidad de ensayo de TSH para los niveles de calibrador 2-5 en presencia de eliminador poroso				
Calibrador	Día 7	Día 14	Día 21	Día 35
Nivel 2	1,010	1,000	1,010	1,031
Nivel 3	1,039	1,044	1,014	1,065
Nivel 4	1,065	1,063	1,041	1,070
Nivel 5	1,049	1,067	1,005	1,064
Promedio	1,041	1,044	1,018	1,058

15 La tabla 5 y la tabla 6 ilustran los efectos de la eliminación de especie libre además de la creación de redes de generación de señales. Tal como se comentó anteriormente los datos muestran un aumento sustancial en la señal de respuesta de inmunoensayo con un ruido de fondo estabilizado en presencia de perlas sensibilizadoras modificadas con biotina.

20

TABLA 5

Curva de calibración del inmunoensayo LOCI de TSH			
Suspensión de perlas sensibilizadoras SAV a 1400 µg/ml con o sin sensibilizador modificado con biotina			
Aditivo	0%	1%	5%
Calibrador	Respuesta de señal de inmunoensayo en cuentas de fotones		
Nivel 1	3534	3658	3433
Nivel 2	50252	83150	93790
Nivel 3	208500	338382	376341
Nivel 4	996960	1554725	1738055
Nivel 5	2556284	3818949	4082537

25

TABLA 6

Curva de calibración de inmunoensayo LOCI de FT3			
Suspensión de perlas sensibilizadoras SAV a 400 µg/ml con o sin sensibilizador modificado con biotina			
Aditivo	0%	1%	5%
Calibrador	Respuesta de señal de inmunoensayo en cuentas de fotones		
Nivel 1	1772532	2157288	2405371
Nivel 2	1062516	1289000	1457286
Nivel 3	615536	761405	874360

ES 2 379 083 T3

Nivel 4	196229	245013	274417
Nivel 5	8520	10008	10852

5 Basándose en estos resultados, queda claro que el uso de un segundo sustrato tal como se describe potencia enormemente la estabilidad de ensayos a lo largo de un periodo extendido y potencia la intensidad de señal. La presente invención permite por tanto pruebas precisas para detectar analitos de interés aunque el ensayo usado contenga un sustrato de fase sólida, que lixivia una especie libre durante el almacenamiento normal o cuando se expone a movimientos o temperaturas no habituales.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de estabilización de un reactivo mediante la inactivación de una primera especie de unión disociada, que comprende: proporcionar un recipiente de almacenamiento de reactivo que incluye un medio líquido que contiene una primera especie de unión fijada a un primer sustrato; un material permeable que incluye una superficie interna que incluye un segundo sustrato que tiene una afinidad por dicha primera especie de unión; y una superficie externa permeable a la primera especie de unión cuando se disocia de dicho sustrato.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la primera especie de unión está fijada a una superficie de unión definida en el primer sustrato, y las regiones de unión en el segundo sustrato están formadas sobre una superficie de unión definida en el segundo sustrato, y en el que la superficie de unión definida en el primer sustrato y la superficie de unión definida en el segundo sustrato están formadas por los mismos materiales.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que la primera especie de unión se selecciona del grupo que consiste en biotina, avidina, estreptavidina, un antígeno, un anticuerpo, un hapteno, un receptor y un oligonucleótido.