

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 427 997**

(51) Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2007 E 07861331 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2047270**

---

(54) Título: **Agentes estabilizantes y ligandos de captura para usar en ensayos que miden las concentraciones de analitos**

(30) Prioridad:

**28.07.2006 US 833786 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.11.2013**

(73) Titular/es:

**BECKMAN COULTER, INC. (100.0%)  
250 S. KRAEMER BOULEVARD  
BREA, CA 92821 , US**

(72) Inventor/es:

**LU, WENYUAN;  
LEITH, KATHERINE M.;  
CHAN, STEPHEN P. y  
WALTON, COURTNEY E.**

(74) Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 427 997 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**

Agentes estabilizantes y ligandos de captura para usar en ensayos que miden las concentraciones de analitos

**5 Referencia a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reclama prioridad sobre la solicitud provisional de EE.UU. 60/833.786 presentada el 28 de julio de 2006.

**10 Antecedentes de la invención**

**Campo de la invención**

15 La presente invención enseña nuevas y útiles composiciones para la medición de concentraciones de analito libre o sin unir en un fluido. La presente invención incluye el uso de captura de ligandos y agentes de estabilización para mejorar la precisión de los ensayos de determinación del analito. También se divultan procedimientos y herramientas para usar la presente invención.

**20 Técnica anterior**

25 Se han desarrollado varios ensayos para medir la concentración de un analito en solución. Por ejemplo, los ensayos han incluido mezclar una solución que contiene un analito con un ligando de captura, eliminar las impurezas mediante lavado y, después, medir el analito asociado con el ligando de captura. Con estos procedimientos de detección existen varias dificultades técnicas. En algunos casos, se produce unión no intencionada de las impurezas al ligando de captura. Adicionalmente, en algunos casos la unión del analito al ligando de captura no es estable y el analito se disocia del ligando. En algunos casos, el analito en una solución puede existir en forma unida (p. ej., unido a una proteína) y en forma no unida y puede ser deseable medir únicamente la concentración de la forma no unida. Por tanto, en algunos casos es necesario estabilizar el equilibrio entre las formas unida y no unida con el fin de obtener una medición precisa y reproducible de la concentración del analito.

30 Para abordar estos problemas, Beckman Coulter, Incorporated (BCI, Fullerton CA) ha usado tradicionalmente una alquilamina tensioactivo con flúor (FC100, fabricado por 3M Corporation, St. Paul, MN) en diversos ensayos de concentración de BCI. FC100 es una mezcla compleja de tensioactivos de amina con flúor que exhibe una considerable variabilidad de un lote a otro en su composición química exacta. De acuerdo con la Ficha de Seguridad de Datos del Material de la 3M Corporation (MSDS, presentada el 8 de febrero de 2000, número de documento 10-3799-3), FC100 contiene agua, éter butílico de dietilenglicol, sal de sodio de fluoroalquilsulfonato y una mezcla comercial secreta de fluorooquímicos orgánicos residuales. Sin quedar anclado a teoría alguna, los inventores creen que un fluoro-tensioactivo con alquilamina facilita la determinación precisa de la cantidad de analito libre sin unir frente al analito presente en una solución de muestra estabilizando el equilibrio y, por tanto, permite una medición precisa de la concentración del analito.

40 Hace varios años, la agencia de protección ambiental de EE.UU. expresó su preocupación acerca de ciertos compuestos de fluorocarbono, tal como ácido octanoico fluorocarbonado y sus derivados, como compuestos potencialmente peligrosos. Por consiguiente, existe la necesidad de una alternativa para sustituir el fluoro-tensioactivo de alquilamina con una composición de ensayo diferente que puede funcionar para determinar la concentración del analito.

50 La presente invención proporciona composiciones nuevas así como procedimientos y kits para usar dichas composiciones en los ensayos para medir con precisión el analito no unido libre en una muestra procedente de un sujeto.

MATVEEVA E G ET AL: Describen "Antigen-antibody interactions in the reverse micellar system: Quenching of the fluorescence of the fluorescein-labeled atrazine by antibodies against atrazine" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK, vol. 234, no. 1, 1 January 1996 (1996-01-01), páginas 13-18.

55 El documento WO/9604555 A describe un inmunoensayo facilitado por detergente de agentes farmacológicos.

El documento EP-A-0061541 describe un análisis inmunológico y, por tanto, un agente bioquímico.

**55 Breve resumen de la invención**

60 La presente invención aborda las necesidades mencionadas anteriormente y los problemas con los que se encuentran con las tecnologías disponibles actualmente.

La presente invención proporciona un procedimiento para medir una concentración de una hormona tiroidea libre, donde la hormona tiroidea existe en un equilibrio entre las formas libre y unida en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

- 65 (a) añadir en un vaso un ligando de captura para la forma libre de la hormona tiroidea;  
 (b) añadir un agente estabilizante, o una sal del mimo, en el vaso, donde el agente estabilizante comprende la

fórmula general RX,

donde R es alquilo C<sub>6-18</sub> y X es sulfato, ácido sulfónico o sulfonato, y donde el agente estabilizante conserva un equilibrio entre las formas libre y unida de la hormona tiroidea; y

donde el agente estabilizante está presente a una

- 5 (i) concentración de 1 a 900 micromolar,
- (ii) concentración de 5 a 850 micromolar,
- (iii) concentración de 25 a 800 micromolar,
- 10 (iv) concentración de 40 a 800 micromolar,
- (v) concentración de 5 a 750 micromolar,
- (vi) concentración de 30 a 700 micromolar,
- (vii) concentración de 25 a 600 micromolar,

- 15 (c) añadir al vaso la muestra que comprende la hormona tiroidea;
- (d) añadir al vaso un sistema de detección; y
- (e) medir la concentración de la hormona tiroidea libre en la muestra usando el sistema de detección.

20 En el presente documento también se describen procedimientos para medir una concentración del analito libre, comprendiendo los procedimientos:

- (a) añadir a un vaso un ligando de captura;
- (b) añadir a un vaso un agente estabilizante;
- (c) añadir al vaso una muestra que comprende el analito libre;
- 25 (d) añadir al vaso un sistema de detección; y
- (e) medir la concentración del analito libre en la muestra usando el sistema de detección.

30 En el presente documento también se describen composiciones para usar en un ensayo que mide la concentración de un analito libre, comprendiendo las composiciones un ligando de captura para el analito libre, y un agente estabilizante, con la condición de que el agente estabilizante no comprenda un fluoro-tensioactivo de alquilamina.

35 En el presente documento también se describen kits para usar en la estimación de una concentración del analito libre, comprendiendo los kits:

- 35 (a) un ligando de captura para el analito;
- (b) un agente estabilizante; y
- (c) un sistema de detección.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender además (d) un patrón de referencia.

40 En el presente documento también se describen agentes estabilizantes que comprenden la fórmula general RX, donde R y X están unidos covalentemente y donde R es un grupo saturado o insaturado alquilo, alcoxi, alcoxialquilo, alcoxialcoxialquilo, alquilaminoalquilo, alquilaminoxialquilo, alcoxiaminoalquilo, fosfonoalquilo, carboxialquilo, carboxialcoxialquilo, carboxialquilaminoalquilo, carboxialquilamidoalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilalquilo, heterociclico, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, siloxano, o carbosilano, cualquiera de los cuales puede estar interrumpido opcionalmente con uno o más átomos de oxígeno, nitrógeno, fósforo o silicio, y en los que uno cualquiera de los sustituyentes R puede estar interrumpido opcionalmente con uno o más de hidroxi, carbonilo, halógeno, fosfato, acetilo, amonio o combinaciones de los mismos, y donde X es sulfato, ácido sulfónico, sulfonato, sulfito, taurato, sulfosuccinato, sulfobetáina, sulfonamida, metoximetanilamida, sulfamilo, sulfeno, clorito, cloruro, yoduro, bromuro, bromato, fluoruro, fluorato, nitrato, nitrito, nitroamina, amino, imino, isocianato, isotiociano, acetamido, acetimido, azido, diazo, ciano, cianato, fosfato, fosfo, fosfono, fosfinilo, fosfino, carboxilato, acrilato, sebacato, ftalato, acetato, óxido, borato, peroxoborato, tetraborato, boranato, silano, ortosilicato, metasilicato, o un silicato metálico, con la condición de que RX no puede ser un fluoro-tensioactivo de alquilamina. Las FIGS. 1 y 2 describen agentes estabilizantes que comprenden la fórmula general RX.

55 En algunas realizaciones, R puede ser alquilo, alquieno, alquino, alcoxialquilo, alcoxialcoxialquilo, alquilaminoalquilo, alquilaminoxialquilo, alcoxiaminoalquilo, fosfonoalquilo, carboxialquilo, carboxialcoxialquilo, donde uno cualquiera de ellos está sustituido opcionalmente con uno o más de hidroxi, carbonilo, halógeno, fosfato, acetilo, amonio o combinaciones de los mismos.

60 En algunas realizaciones, R puede ser propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, 2-metil butilo, 2-etilbutilo, 2-propilbutilo, 3-metil butilo, 3 -etil butilo, 3-propil pentilo, 2-metil pentilo, 2-etil pentilo, 2-propil pentilo, 3-metil pentilo, 3-ethyl pentilo, 3-propil pentilo, 4-metil pentilo, 4-ethyl pentilo, 4-propil pentilo, 2-metil hexilo, 2-etil hexilo, 2-propil hexilo, 3-metil hexilo, 3-ethyl hexilo, 3-propil hexilo, 4-metil hexilo, 4-ethyl hexilo, 4-propil hexilo, 5-metil hexilo, 5-ethyl hexilo, 5-propil hexilo, 2-metil heptilo, 2-etil heptilo, 2-propil heptilo, 3-metil heptilo, 3-ethyl heptilo, 3-propil heptilo, 4-metil heptilo, 4-ethyl heptilo, 4-propil heptilo, 5-metil heptilo, 5-ethyl heptilo, 5-propil heptilo, 6-metil heptilo, 6-ethyl heptilo, 6-propil heptilo, 2-metil octilo, 2-etil octilo, 2-propil octilo, 3-metil octilo, 3-ethyl octilo, 3-propil octilo, 4-metil

octilo, 4-etil octilo, 4-propil octilo, 5-metil octilo, 5-etil octilo, 5-propil octilo, 6-metil octilo, 6-etil octilo, 6-propil octilo, cualquiera de los cuales se puede sustituir opcionalmente con uno o más de hidroxi, carbonilo, halógeno, fosfato, acetilo, amonio o combinaciones de los mismos.

5 En algunas realizaciones, X puede ser un sulfato, ácido sulfónico, sulfonato, sulfito, taurato, sulfosuccinato, sulfobetaina, sulfonamida, metoximetanilamida, sulfamilo o sulfeno, preferentemente sulfato, ácido sulfónico, sulfosuccinato o taurato.

10 En algunas realizaciones, R es alquilo C<sub>6-18</sub> y X es sulfato, sulfonato o ácido sulfónico. En algunas realizaciones, el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en 2-etil-hexil-sulfato; ácido 1-hexanosulfónico, o una sal del mismo; ácido 1-heptanosulfónico o una sal del mismo; ácido 1-octanosulfónico, o una sal del mismo; ácido 1-decanosulfónico o una sal del mismo; C<sub>14-16</sub> olefinsulfonato sódico; dodecilsulfato sódico; dioctil sulfosuccinato sódico; N-oleil-N-metiltaurato sódico; polioxietilenlaurilsulfato sódico; alquilbencil sulfonato; de amina, etil-hexil sulfato sódico y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente estabilizante es 2-etil-hexilsulfato. En algunas realizaciones, la composición comprende una sal del agente estabilizante.

15 En algunas realizaciones, el analito es una hormona, fármaco o vitamina. En algunas realizaciones, el analito comprende un enantiómero sencillo o una forma desyodinada del analito.

20 En algunas realizaciones, el ligando de captura y el agente estabilizante se combinan de un modo tal que mantiene el equilibrio entre el analito libre y el analito unido en una muestra que se va a analizar.

25 En algunas realizaciones, una fracción en volumen del agente estabilizante es de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,1 por ciento en volumen.

30 En algunas realizaciones, una concentración del agente estabilizante es de aproximadamente 5 a aproximadamente 750 micromolar.

35 En algunas realizaciones, una concentración del 2-etil-hexil-sulfato es de aproximadamente 0,004 a aproximadamente 0,015 por ciento en volumen.

40 En algunas realizaciones, una concentración del 2-etil-hexil-sulfato es de aproximadamente 75 a aproximadamente 650 micromolar.

45 En algunas realizaciones, el ligando de captura se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, imitador del anticuerpo o proteína de unión específica al analito, tal como factor intrínseco o proteína de unión al folato. En algunas realizaciones, el ligando de captura se inmoviliza sobre una fase sólida, en algunas realizaciones, el ligando de captura es una proteína de unión específica al analito. En algunas realizaciones, el ligando de captura es un anticuerpo.

50 En algunas realizaciones, el analito es una hormona tiroidea.

55 En el presente documento también se describe un sistema de inmunoensayo. En algunas realizaciones, un sistema de inmunoensayo comprende partículas paramagnéticas recubiertas con una molécula de unión específica de la biotina, una proteína de captura específica del analito biotinilado o una combinación de los mismos.

60 En algunas realizaciones, el sistema de inmunoensayo comprende un marcador detectable.

#### Breve descripción de las figuras

50 La FIG. 1 es un gráfico que ilustra varios grupos R (I a VIII) para formar los agentes estabilizantes divulgados en la presente invención.

55 La FIG. 2 es un gráfico que ilustra varios grupos X (I a VIII) para formar los agentes estabilizantes divulgados en la presente invención.

La FIG. 3 es un gráfico que ilustra varios compuestos RX evaluados como agentes estabilizantes divulgados en la presente invención. "% V/V en el cono de trabajo" se refiere a la concentración del agente estabilizante analizado que era soluble.

La FIG. 4 es un gráfico que ilustra varios homólogos de EHS evaluados como agentes estabilizantes divulgados en la presente invención. "% V/V en el cono de trabajo" se refiere a la concentración del agente estabilizante analizado que era soluble.

#### Descripción detallada de la invención

65 La presente invención está dirigida a un procedimiento para medir la concentración de una hormona tiroidea libre.

En el presente documento también se describe una composición para usar en un ensayo que mide la concentración

de un analito libre, comprendiendo la composición un ligando de captura para el analito libre, y un agente estabilizante, con la condición de que el agente estabilizante no comprenda un fluoro-tensioactivo de alquilamina.

- 5 Se entiende que, como se usa en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el/la" incluyen las referencias en singular y plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, "un agente estabilizante" incluye un único agente estabilizante así como dos o más agentes estabilizantes diferentes en combinación.
- 10 La expresión "opcionalmente derivado" se refiere a la molécula o resto molecular sujeto que está opcionalmente sustituida, opcionalmente interrumpida o ambas cosas. La expresión "opcionalmente sustituido" se refiere a la sustitución de un átomo de hidrógeno o de carbono en una molécula o resto molecular sujeto en intercambio de un átomo o un grupo de átomos. La expresión "opcionalmente interrumpido" como se describe en el presente documento hace referencia a la inserción de Si, O, N S, o P en una estructura de una cadena de carbono o de una cadena de siloxano. En algunas realizaciones, la expresión "opcionalmente derivado" se refiere a la sustitución o interrupción con uno o más de oxígeno, nitrógeno, halógeno o un resto que contiene un oxígeno, nitrógeno o halógeno.
- 15 En la presente invención, R es alquilo C<sub>6-18</sub>. En el presente documento también se describen composiciones que comprenden grupos R con definiciones alternativas.
- 20 La composición descrita en el presente documento se puede usar en un ensayo que mide la concentración de un analito libre. La composición puede comprender (i) un ligando de captura para el analito libre; y (ii) un agente estabilizante, donde el agente estabilizante comprende a fórmula general RX, o una sal del mismo, donde R es un alquilo o arilo saturado o insaturado, o un polímero basado en silicio, cualquiera de los cuales está derivado opcionalmente con uno o más restos que contienen oxígeno, nitrógeno, halógeno o una combinación de los mismos, y donde X es un oxoanión u óxido de azufre o fósforo, un oxoanión o derivado de carbonilo de nitrógeno, un carboxilato, un borato, un silicato, o un halógeno, con la condición de que el agente estabilizante no comprende un fluoro-tensioactivo de alquilamina.
- 25 En el presente documento también se describen agentes estabilizantes de la fórmula general RX, o una sal del mismo, donde R es un grupo saturado o insaturado alquilo, alcoxi, alcoxialquilo, alcoxialcoxialquilo, alquilaminoalquilo, alquilaminoxialquilo, alcoxiaminoalquilo, fosfonoalquilo, carboxialquilo, carboxialcoxialquilo, carboxialquilaminoalquilo, carboxialquilamidoalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilalquilo, heterociclico, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, siloxano, silicona o carbosilano, cualquiera de los cuales puede estar interrumpido opcionalmente con uno o más átomos de oxígeno, nitrógeno, fósforo o silicio, y en los que uno cualquiera de los sustituyentes R puede estar interrumpido opcionalmente con uno o más de hidroxi, carbonilo, halógeno, fosfato, acetilo, amonio o combinaciones de los mismos, y donde X es sulfato, ácido sulfónico, sulfonato, sulfito, taurato, sulfosuccinato, sulfobetaína, sulfonamida, metoximetanilamida, sulfamilo, sulfeno, clorito, cloruro, yoduro, bromuro, bromato, fluoruro, fluorato, nitrato, nitrito, nitroamina, amino, imino, isocianato, isotiociano, acetamido, acetimido, azido, diazo, ciano, cianato, fosfato, fosfo, fosfono, fosfinilo, fosfino, carboxilato, acrilato, sebacato, ftalato, acetato, óxido, borato, peroxoborato, tetraborato, boranato, silano, ortosilcato, metasilicato, o un silicato metálico, con la condición de que RX no sea un fluoro-tensioactivo de alquilamina, es decir R no es una fluoroalquilamina.
- 30 En las Figura 1 y 2 indican varios grupos R y X del agente estabilizante de la presente invención. En algunas realizaciones, los agentes estabilizantes pueden ser de una fórmula RX. En otras realizaciones, los agentes estabilizantes pueden ser de una fórmula tal como RXR', XRX' y RXR'X'. En la presente invención, cuando el agente estabilizante es de la fórmula RXR', XRX' y RXR'X', R y R', o X y X' pueden ser la misma molécula o resto molecular sujeto u, opcionalmente, pueden ser moléculas o restos moleculares sujeto diferentes.
- 35 En algunas realizaciones, R se selecciona del grupo que consiste en siloxano lineal o ramificado, carboxilano lineal o ramificado, alquilo, cicloalquilo, heterociclico, arilalquilo, heteroarilo lineales o ramificados, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, R es un alquilo, arilo o polímero basado en silicio opcionalmente sustituido con uno o más de hidroxi, ceto, carbonilo, carboxi o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, R es un éter, un éster o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, R comprende polioxipropileno o polioxietileno.
- 40 En algunas realizaciones, R es un alquilo, arilo o polímero basado en silicio opcionalmente sustituido con uno o más restos que contienen nitrógeno que comprenden amina, amino, imina, imino, amida, amonio o combinaciones de los mismos.
- 45 En algunas realizaciones, R puede ser alquilo, alquieno, alquino, alcoxialquilo, alcoxialcoxialquilo, alquilaminoalquilo, alquilaminoxialquilo, alcoxiaminoalquilo, fosfonoalquilo, carboxialquilo, carboxialcoxialquilo, donde uno cualquiera de ellos está sustituido opcionalmente con uno o más de hidroxi, carbonilo, halógeno, fosfato, acetilo, amonio o combinaciones de los mismos.
- 50 En algunas realizaciones, R como se define en el presente documento puede estar opcionalmente sustituido con

hidroxi, carboxi, amina, óxido de amina, fosfato, acetato, carboxilato, derivados de amonio de alquilo o arilo o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, R está opcionalmente sustituido con uno o más de hidroxi, oxo, acetato, amonio, carboxi, amino u óxido de amina.

- 5 En algunas realizaciones, R es un alquilo o arilo, donde uno cualquiera de ellos está opcionalmente sustituido con uno o más de hidroxi, carbonilo, halógeno, fosfato, acetilo, amonio o combinaciones de los mismos. Realizaciones de la invención incluyen donde R es alquilo y alquilo es un alquilo C<sub>1-30</sub>, alquilo C<sub>1-22</sub>, alquilo C<sub>1-16</sub>, alquilo C<sub>1-12</sub>, alquilo C<sub>1-10</sub> o alquilo C<sub>1-8</sub>. En algunas realizaciones, el resto alquilo es alquilo C<sub>4-30</sub>, alquilo C<sub>4-22</sub>, alquilo C<sub>4-18</sub>, alquilo C<sub>4-16</sub>,alquilo C<sub>4-14</sub> o alquilo C<sub>4-12</sub>, En algunas realizaciones, el resto alquilo es alquilo C<sub>6-30</sub>, alquilo C<sub>6-22</sub>, alquilo C<sub>6-18</sub>, alquilo C<sub>6-16</sub>,alquilo C<sub>6-14</sub> o alquilo C<sub>6-12</sub>, En algunas realizaciones, el alquilo es un alquilo C<sub>7-30</sub>, alquilo C<sub>7-22</sub>, alquilo C<sub>7-18</sub>, alquilo C<sub>7-14</sub>, alquilo C<sub>7-12</sub> o alquilo C<sub>7-9</sub>, sustituido opcionalmente con uno o más de hidroxi, carbonilo, halógeno, fosfato, acetilo, amonio o combinaciones de los mismos.
- 10 Los sustituyentes alquilo pueden incluir propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, 2-metilo butilo, 2-etilbutilo, 2-propilbutilo, 3-metil butilo, 3 -etil butilo, 3-propil pentilo, 2-metil pentilo, 2-etyl pentilo, 2-propil pentilo, 3-metil pentilo, 3-etyl pentilo, 3-propil pentilo, 4-metil pentilo, 4-etyl pentilo, 4-propil pentilo, 2-metil hexilo, 2-etyl hexilo, 2-propil hexilo, 3-metil hexilo, 3-etyl hexilo, 3-propil hexilo, 4-metil hexilo, 4-etyl hexilo, 4-propil hexilo, 5-metil hexilo, 5-etyl hexilo, 5-propil hexilo, 2-metil heptilo, 2-etyl heptilo, 2-propil heptilo, 3-metil heptilo, 3-etyl heptilo, 3-propil heptilo, 4-metil heptilo, 4-etyl heptilo, 4-propil heptilo, 5-metil heptilo, 5-etyl heptilo, 5-propil heptilo, 6-metil heptilo, 6-etyl heptilo, 6-propil heptilo, 2-metil octilo, 2-etyl octilo, 2-propil octilo, 3-metil octilo, 3-etyl octilo, 3-propil octilo, 4-metil octilo, 4-etyl octilo, 4-propil octilo, 5-metil octilo, 5-etyl octilo, 5-propil octilo, 6-metil octilo, 6-etyl octilo, 6-propil octilo, cualquiera de los cuales se puede sustituir opcionalmente con uno o más de hidroxi, carbonilo, halógeno, fosfato, acetilo, amonio o combinaciones de los mismos.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- En algunas realizaciones, R puede ser un homólogo de olefina de alquilo, con uno o más enlaces carbono-carbono insaturados. Es decir, en algunas realizaciones, uno cualquiera de los sustituyentes de R como se describe en el presente documento puede estar insaturado. Ejemplos de sustituyentes insaturados par R incluyen, entre otros, alquenilo, alquenoxi, alqueniloxialquilo, alqueniloxialcoxialquilo, alquenilaminoalquilo, alquenilaminooxialquilo, alqueniloxiaminoalquilo, fosfonoalquenilo, carboxialquenio, carboxialqueniloxialquilo, carboxialquenilaminoalquilo, carboxialquenilamidoalquilo. El término “alquenilo” se refiere a grupos alquenilo C<sub>2-22</sub>, preferentemente alquenilo C<sub>4-18</sub>, o, más preferentemente, alquenilo C<sub>6-18</sub> o alquenilo C<sub>7-14</sub>. El término alquenilo incluye todos los estereoisómeros, es decir los isómeros cis y trans, así como los isómeros E y Z. En algunas realizaciones, el alquilo insaturado puede comprender un alquino. El término “alquino” se refiere a grupos alquino C<sub>2-22</sub>, preferentemente alguno C<sub>4-18</sub>, o, más preferentemente, alquino C<sub>6-18</sub> o alquino C<sub>7-14</sub>, donde puede haber uno o más triples enlaces en la cadena de alquilo.
- En algunas realizaciones, uno cualquiera de los sustituyentes como se define en el presente documento para R puede estar saturado.
- En algunas realizaciones, R puede ser un derivado cíclico, policíclico o heterocíclico de alquilo o arilo, es decir R es un cicloalquilo, heterociclico, arilo o heteroarilo. En algunas realizaciones, el cicloalquilo, heterociclico, arilo o heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituido con uno o más de hidroxi, carbonilo, halógeno, fosfato, acetilo, amonio o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el término cicloalquilo, heterociclico, arilo o heteroarilo puede hacer referencia a un anillo bicíclico o a un anillo tricíclico.
- El término “cicloalquilo” se refiere a un grupo alquilo ciclado que está saturado o parcialmente insaturado. Grupos cicloalquilo pueden incluir cicloalquilo C<sub>3-8</sub>. Grupos cicloalquilo típicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.
- El término “heterociclico” o “heterocíclico” se refiere a un derivado de cicloalquilo interrumpido con Si, O, N, P, o combinaciones de los mismos. Más específicamente, el término “heterociclico” o “heterocíclico” se usa en el presente documento hace referencia a un sistema anular monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado o bicíclico de 3-14 miembros, que consiste en átomos de carbono y de uno a cuatro heteroátomos seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en Si, O, N, P, o combinaciones de los mismos. Ejemplos incluyen, entre otros, tetrahidofuranilo, tetrahidropiranilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, pirazolidinilo, dihidrofuranilo, morfolinilo, dihidroimidazolilo, dihidropiranilo, dihidrooxazolilo, tetrahidrooxazolilo, 2-azabiciclo[2.2.1]heptanilo, 2,5-diazabiciclo[2.2.1]heptanilo, oxazinilo, isoxazinilo, oxatiazinilo y similares. Los grupos heterocíclicos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más metilo, etilo, oxo, halógeno, hidroxi, amino, alquilamino, hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxipropilo, metoximetilo, carboxi o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el término “heterociclico” se refiere a un grupo cicloalquilo que contiene oxígeno en el anillo, es decir un éter cíclico tal como tetrahidrofurano o tetrahidropirano. En algunas realizaciones, el término “heterociclico” se refiere a un grupo cicloalquilo que contiene nitrógeno y oxígeno en el anillo.
- El término “arilo” se refiere a cualquier estructura de anillo aromático o cualquier estructura de anillo de carbono con propiedades aromáticas. Los arilos preferidos incluyen arilo C<sub>6-14</sub>, especialmente C<sub>6-10</sub>, tal como fenilo o naftilo, y, lo más preferentemente, arilo de seis carbonos. Los grupos arilo están opcionalmente sustituidos con uno o más metilo, etilo, oxo, halógeno, hidroxi, alcoxi, amino, alquilamino, halógeno, hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxipropilo,

metoximetilo o carboxi. Preferentemente, los grupos arilo están opcionalmente sustituidos con uno o más metilo, etilo, halógeno, hidroxi, hidroximetilo, hidroxietilo o carboxi.

- 5 El término "heteroarilo" se refiere a un derivado de arilo, donde el anillo arilo está interrumpido con Si, O, N, P, o combinaciones de los mismos. Más específicamente, el término "heteroarilo" se refiere a sistemas anulares heteroaromáticos de 5-14 miembros y, lo más preferentemente, a sistemas anulares heteroaromáticos de cinco o seis miembros, en los que de uno a cuatro átomos en la estructura del anillo son heteroaromáticos seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en Si, O, N, P, o combinaciones de los mismos. Ejemplos incluyen, entre otros, tetrazolilo, piridinilo, imidazolilo, oxazolilo, furanilo, oxazolilo, tiazolilo, pirrolilo, tienilo, pirazolilo, triazolilo, por ejemplo, 1,2,3-triazolilo y 1,2,4-triazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, por ejemplo 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo y 1,3,4-oxadiazolilo, oxatriazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, por ejemplo 1,2,3-triazinilo y 1,2,4-triazolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, benzofuranilo, benzotienilo, bencimidazolilo e indazolilo. En algunas realizaciones, el término "heteroarilo" se refiere a un grupo arilo que contiene oxígeno, nitrógeno o los dos en el anillo.
- 10 15 En algunas realizaciones, R es un ácido graso o un homólogo de un ácido graso. El término ácido graso hace referencia a un carboxialquilo, carboxialcoxialquilo, carboxialquilaminoalquilo, carboxialquilamindoalquilo saturado o insaturado, o una sal o éster de los mismos, sustituido opcionalmente con hidroxi, alquilo C<sub>1-4</sub>, halógeno o alcoxi. En algunas realizaciones, el carboxialquilo es carboxialquilo C<sub>2-30</sub>, carboxialquilo C<sub>2-20</sub>, carboxialquilo C<sub>2-18</sub>, carboxialquilo C<sub>2-16</sub>, carboxialquilo C<sub>2-14</sub>, carboxialquilo C<sub>2-10</sub> o carboxialquilo C<sub>2-8</sub> interrumpido opcionalmente con uno o más de Si, O, N, P, o combinaciones de los mismos.. En algunas realizaciones, el término carboxialquilo es carboxialquilo C<sub>6-30</sub>, carboxialquilo C<sub>6-20</sub>, carboxialquilo C<sub>6-18</sub>, carboxialquilo C<sub>6-16</sub>, carboxialquilo C<sub>6-14</sub>, carboxialquilo C<sub>6-10</sub> o carboxialquilo C<sub>6-8</sub> sustituido opcionalmente con uno o más de Si, O, N, P, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el carboxialquilo es ácido butanoico, ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, ácido icosanoico o ácido docosanoico.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 En algunas realizaciones, R es un éster de un ácido graso, es decir R es un carboxialquilo interrumpido opcionalmente con un éster. Ejemplos de carboxialquilos interrumpidos con un éster incluyen, entre otros, carboxialcoxialquilo o carboxialcoxialcoxialquilo. En algunas realizaciones, R es un derivado de alcanoamida de un ácido graso, es decir R es un carboxialquilo interrumpido con un grupo amido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R es un carboxialquilamido o carboxialquilamidoalquilo. En algunas realizaciones, R es un ácido graso oxietilado.
- 35 En la presente invención, R puede ser un derivado de ácido graso interrumpido opcionalmente con Si, O, N, P, o combinaciones de los mismos, es decir, en algunas realizaciones R es un carboxialquilo interrumpido opcionalmente con Si, O, N, P, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, R es un carboxialquilo opcionalmente sustituido con un halógeno. En algunas realizaciones, R es un carboxialquilo cargado, es decir R es un derivado aniónico o catiónico de un ácido graso.
- 40 En algunas realizaciones, R es un alcohol o derivado de alcohol. Por ejemplo, R puede ser un alquilfenol o un éster de un alcohol. En algunas realizaciones, R es un alcohol o fenol interrumpido opcionalmente con Si, O, N, P, o combinaciones de los mismos, sustituido opcionalmente con un halógeno o ambos.
- 45 En algunas realizaciones, R es un éster derivado poliéster de un alquilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el R es un alcoxialquilo, alcoxialcoxialquilo o alcoxialcoxialcoxialquilo saturado o insaturado, preferentemente alcoxialquilo C<sub>2-20</sub>, alcoxialcoxialquilo C<sub>2-20</sub> o alcoxialcoxialcoxialquilo C<sub>2-20</sub>; un alquilo C<sub>5-16</sub>, alcoxialquilo C<sub>5-16</sub>, alcoxialcoxialquilo C<sub>5-16</sub>, alcoxialcoxialquilo C<sub>5-16</sub>, alcoxialcoxialcoxialquilo C<sub>5-16</sub>; o un alcoxialquilo C<sub>7-14</sub>, alcoxialcoxialquilo C<sub>7-14</sub> o alcoxialcoxialcoxialquilo C<sub>7-14</sub>; uno cualquiera de los cuales puede estar sustituido opcionalmente con uno o más de hidroxi. En algunas realizaciones, el término poliéster es un compuesto de la fórmula general [(CH<sub>q</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>X<sub>p</sub>]<sub>m</sub>, en la que X es alquilo C<sub>1-10</sub>, alquenilo C<sub>1-10</sub> o alcoxialquilo C<sub>1-10</sub>, p es 0 o 1, q es 1 o 2, n es 1-10, y m es 1-100, preferentemente 1-20 o 1-10. En algunas realizaciones, el derivado éster o poliéster de alquilo está sustituido opcionalmente con un o más hidroxi.
- 55 En algunas realizaciones, R es un polioxialquileno. El término polioxialquileno se refiere a una molécula o resto molecular de alquileno sujeto que está interrumpida con dos o más átomos de oxígeno. En algunas realizaciones, el término polioxialquileno hace referencia a C<sub>1-21</sub>, un polioxialquileno O<sub>1-14</sub> o un polioxialquileno C<sub>1-14</sub>, O<sub>1-7</sub>. Ejemplos de polioxialquilenos adecuados para usar en la presente invención incluyen, entre otros, polioxietileno, polioxipropileno, polioxibutileno, polioxihexileno, polioxihentileno o polioxiocitileno. En algunas realizaciones, un R es un copolímero de dos o más grupos polioxietileno, polioxipropileno, polioxibutileno, polioxipentileno, polioxihexileno, poloxiheptileno o poloxioctileno. En algunas realizaciones, R es un copolímero oxietilado con otros restos orgánicos o inorgánicos.

- En algunas realizaciones, R puede ser una poliaminas, óxidos de amina, amina etoxilada y otros derivados de amina de alquilo. La expresión "derivado de poliaminas" hace referencia a una cadena alquilo donde dos o más átomos de carbono en la cadena alquilo están sustituidos con nitrógeno. El término también incluye monoalquilaminas así como dialquilaminas. La expresión "derivado de óxido de amina" hace referencia a una cadena alquilo donde dos o más átomos de carbono en la cadena alquilo están sustituidos con un nitrógeno y un oxígeno (es decir, -N-O-). Por ejemplo, R puede ser alquilaminooxialquilo, carboxialquilaminooxialquilo, alquilaminooxialquilo o alcoxiaminoalquilo. En algunas realizaciones, el derivado de poliaminas o derivado de óxido de amina está sustituido opcionalmente con un etoxilato.
- 5
- En algunas realizaciones, R es un polímero basado en silicio. La expresión "polímero basado en silicio" se refiere a monómeros u idos, donde cada monómero contiene al menos un átomo de silicio. Por ejemplo, la expresión polímero basado en silicio puede incluir, entre otros, siloxanos, siliconas o carbosilanos. En algunas realizaciones, el polímero basado en silicio puede estar bloqueado en su extremo con un grupo terminal que no contiene silicio.
- 10
- En algunas realizaciones, R es un siloxano lineal, ramificado o cíclico.. En algunas realizaciones, R es un siloxano opcionalmente sustituido con uno o más de hidroxi, carbonilo, alquilo, halógeno, haloalquilo, hidroxialquilo, fosfato acetilo, amonio o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, R es Si<sub>1-21</sub>, siloxano O<sub>1-21</sub>, siloxano Si<sub>3-14</sub>, O<sub>3-14</sub> o siloxano Si<sub>5-10</sub>, O<sub>5-10</sub>. En otras realizaciones, R es carbosilano. El término carbosilano hace referencia a un polímero con un carbono y silicio en su estructura. En algunas realizaciones, R es un carboxilano opcionalmente sustituido con uno o más de hidroxi, carbonilo, alquilo, halógeno, haloalquilo, hidroxialquilo, fosfato, acetilo, amonio o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, R es carboxilano Si<sub>1-21</sub>, carbosilano C<sub>1-21</sub>, carbosilano Si<sub>3-14</sub>, C<sub>1-14</sub> o carbosilano Si<sub>5-10</sub>, carbosilano C<sub>5-10</sub>. En algunas realizaciones, el siloxano o carbosilano está bloqueado en su extremo, por ejemplo bloqueado en el extremo co vinilo o silanona. En algunas realizaciones, R es siloxano o carbosilano opcionalmente sustituido con uno o más de alquilo, halógeno, haloalquilo, hidroxialquilo, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el siloxano o carbosilano puede ser metilo, etilo, propilo, butilo o ventilo sustituido, o combinaciones de los mismos.
- 15
- En algunas realizaciones, R comprende copolímeros de silicio con poliéster, poliéster, poliol, poliaminas, poliuretano, polioxietileno, polioxipropileno y otros restos poliméricos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R es siloxano o carbosilano opcionalmente sustituido con uno o más de poliéster, poliol, poliaminas, poliuretano, polioxietileno, polioxipropileno o combinaciones de los mismos. El siloxano o carbosilano de la presente invención puede incluir sus sales, éteres y ésteres. En algunas realizaciones, R es un siloxano o carbosilano cargado, por ejemplo un derivado catiónico o derivado aniónico de un siloxano. En algunas realizaciones, R es una sal siloxano o carbosilano, por ejemplo una sal de amonio. En algunas realizaciones, R comprende siliconas derivadas con éster de cadena larga, alcohol de cadena larga, amina de cadena larga, o combinaciones de los mismos.
- 20
- 25
- 30
- 35
- La invención proporciona grupos funcionales X, donde X es sulfato, ácido sulfónico o sulfonato.
- También se describen varios grupos funcionales X. En algunas realizaciones, X es un oxoanión u óxido de azufre o fósforo, un oxoanión o derivado de carbonilo de nitrógeno, un carboxilato, un borato o un silicato. En algunas realizaciones, X es sulfato, ácido sulfónico, sulfonato sulfito, sulfóxido, taurato, sulfosuccinato, sulfobetaina, sulfonamida, fosfato, fosos, fosfono, fosfinilo, nitrato, nitrito, amino, imino, ixodiano, isotiociano, acetamida, acetimido, azido, diazo, ciano, cianato, alquilcarboxilato, acrilato, sebacato, ftalato, borato, tetraborato, ortosilicato, metasilicato, silicato de metilo, cloro, cloruro, yoduro, yodato, bromuro, formiato, fluoruro o fluorato. En algunas realizaciones, X es sulfato, ácido sulfónico, sulfonato, sulfosuccinato o taurato.
- 40
- 45
- En algunas realizaciones, X es un grupo funcional que contiene un átomo de azufre. Ejemplos incluyen, entre otros, cualquier grupo funcional que contiene sulfato, sulfonato o ácido sulfónico. La expresión "oxoanión u óxido de azufre" hace referencia a un sulfato, ácido sulfónico, sulfonato, sulfito, taurato, sulfosuccinato, sulfobetaina, sulfonamida, metoximetanilamida, sulfamilo o sulfeno.
- 50
- También se describe que X puede ser cualquier grupo funcional que contiene un halógeno. Ejemplos incluyen, entre otros, cualquier grupo funcional que contiene un grupo de cloro, flúor, bromo, yodo o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, X puede ser clorito, cloruro, yoduro, yodato, bromuro, bromato, fluoruro o fluorato.
- 55
- También se describe que X puede ser cualquier grupo funcional que contiene un nitrógeno. Ejemplos incluyen, entre otros, cualquier grupo funcional que contiene un grupo nitrato, nitrito, nitroamina, amino, imino, isocianato, isotiociano, acetamido, acetimido, azido, diazo, ciano, cianato, nitroso, nitrosoimino, nitramino, nitro, o combinaciones de los mismos.
- 60
- También se describe que X puede ser cualquier grupo funcional que contiene un fósforo. La expresión "oxoanión u óxido de fósforo" hace referencia a un fosfato, fosfo, fosfono, fosfinilo o fosfino.
- 65
- También se describe que X es carboxilato, acrilato, sebacato, ftalato, acetato u óxido. En algunas realizaciones, X puede ser cualquier grupo funcional que contiene un boro. Ejemplos incluyen, entre otros, borato, peroxoborato, tetraborato o boranato.

También se describe que X puede ser cualquier grupo funcional que contiene un átomo de silicio. Ejemplos incluyen, entre otros, silano, ortosilicato, metasilicato o un silicato metálico.

Se realizó una detección selectiva de muchos agentes estabilizantes que, en su caso, podrían reemplazar e fluorotensioactivo de alquilamina y que, no obstante, no tienen un impacto negativo sobre la precisión de los ensayos. Sin estar limitados a teoría alguna, los inventores han postulado que los agentes estabilizantes mantienen la proporción entre el analito libre y el analito unido de una muestra, de modo que previenen la alteración del equilibrio entre el analito libre no unido frente al analito unido en el fluido biológico de un sujeto o en un sistema *in vitro*.

En una realización, el agente estabilizante comprende la fórmula general RX, donde R comprende un grupo químico que contiene un alquilo, un arilo, un ácido graso, un alcohol, un éster, un éter, un oxialquilato, o un siloxano, y X comprende un grupo químico que contiene azufre. Cuando RX comprende un halógeno, el resto halógeno puede ser cualquier halógeno, por ejemplo F, Cl, Br o I, con la condición de que la presente invención no comprenda un fluorotensioactivo de alquilamina, tal como FC100.

En una realización, la presente invención identifica el agente estabilizante como un compuesto derivado de alcohol alquílico, por ejemplo 2-etil-hexilsulfato (EHS). La estructura química general de dichos compuestos derivados de alcohol alquílico es  $C_nH_{2n+1}X$ , donde n es de aproximadamente 6 a aproximadamente 18, y X es un derivado de sulfato, por ejemplo  $SO_4^-Na^+$  para la sal de sodio del ejemplo 2-etil-hexilsulfato que tiene la estructura química:  $CH_3(CH_2)_3CH(C_2H_5)CH_2OSO_3^-Na^+$ . X también puede ser cualquiera de los grupos que contienen azufre divulgados en la FIG. 2, Grupo X.

Otros agentes estabilizantes descritos incluyen: Ácido 1-hexano sulfónico o una sal del mismo (por ejemplo, sal de  $Na^+$ ); ácido 1-heptano sulfónico o una sal del mismo (por ejemplo, sal de  $Na^+$ ); ácido 1-octano sulfónico, o una sal del mismo (por ejemplo, sal de  $Na^+$ ); ácido 1-decano sulfónico o una sal del mismo (por ejemplo, sal de  $Na^+$ );  $C_{14-16}$  olefina sulfonato sódico (Nº CAS 68439-57-6); dodecilsulfato sódico; dioctil sulfosuccinato sódico; N-oleil-N-metiltaurato sódico; polioxietilenlauril sulfato sódico (peso molecular: 346); amina alquilbencilsulfonato (peso molecular: 385); y etilhexilsulfato sódico.

En el presente documento se describen nuevas y útiles composiciones para uso en la medición diagnóstica de las concentraciones de analito libre o sin unir en un fluido. En algunas realizaciones, el analito está presente en un fluido biológico. El fluido biológico puede ser plasma o suero. También puede estar compuesto por fluido seminal, saliva, orina, soluciones fecales, líquido cefalorraquídeo o fluidos gástricos. No obstante, en general, el fluido biológico es plasma o suero. Las composiciones de la presente invención también se pueden usar en un sistema *in vitro* que comprenden sobrenadante o filtrado de cultivo celular. La expresión "fluido biológico" incluye fluidos de un organismo biológico, así como fluidos derivados de un organismo biológico, por ejemplo fluidos que se han fraccionado, diluido, modificado químicamente o combinaciones de los mismos.

En el presente documento se describen analitos que pueden ser cualquier molécula pequeña, tal como, entre otros, una hormona, un fármaco o una vitamina. En algunas realizaciones, el analito está presente en un estado de equilibrio entre la condición de no unido libre y la condición de unido (p. ej., unido a proteína). Por ejemplo, el analito puede ser una hormona tiroidea o vitamina B12. Otros analitos descritos incluyen las siguientes clases de hormonas de vertebrados:

- Hormonas de amina:
  - a. Derivadas de tirosina (anillos aromáticos simples)
    - Catecolaminas (p. ej., adrenalina, noradrenalina, dopamina).
    - Hormonas tiroideas (p. ej., T4, o isómeros de T3, T2 y T1).
  - b. Derivadas de triptófano (compuestos aromáticos policíclicos y heterocíclicos)
    - Melatonina, serotonina.
- Hormonas peptídicas:
  - a. Péptidos pequeños, por ejemplo
    - La angiotensina IV tiene 6 residuos de aminoácidos, la angiotensina III y la angiotensina II tienen 7 y 8 aminoácidos, respectivamente. Debido al pequeño tamaño molecular, es probable que estos péptidos estén unidos a moléculas transportadoras en plasma, tales como proteínas.
    - El péptido natriurético cerebral (BNP), 32 aminoácidos. Otras hormonas peptídicas natriuréticas incluyen el péptido natriurético atrial (ANP) y el péptido natriurético de tipo C (CNP).
    - Calcitonina, péptido de 32 aminoácidos, derivada del precursor, la procalcitonina.
    - La hormona adrenocorticotropa (ACTH) tiene 39 aminoácidos.

- La insulina es un péptido de 51 aminoácidos.
  - Hormona paratíofide (PTH), 84 aminoácidos. La PTH también se produce en varios fragmentos diferentes que tienen diferentes utilidades clínicas. PTH intacta, PTH N-terminal; PTH de molécula media y PTH C-terminal.
- 5 b. Péptidos grandes (los péptidos grandes dan moléculas proteicas más pequeñas tras la disociación de multímeros proteicos o después de la fragmentación. Estas moléculas más pequeñas pueden circular en un equilibrio con las moléculas transportadoras), por ejemplo:
- 10 - Hormona estimulante del folículo (FSH).
  - Hormona luteinizante (LH).
  - Hormona estimulante tiroideas (TSH).
  - Gonadotropina coriónica (p. ej., hCG).
  - Hormona liberadora de la tirotropina (TRH).
  - Prolactina (PRL).
  - Eritropoyetina (EPO).
- 15 • Hormonas esteroideas o de esterol: La presente invención es útil para las hormonas esteroideas o de esterol que tienen una forma libre en equilibrio con una forma que está unida a moléculas de transporte en plasma, tales como proteínas. La forma libre es biológicamente activa y tiene utilidad clínica.
- 20 a. Hormonas esteroideas, por ejemplo
- 25 - Cortisol: Aproximadamente el 4% del cortisol circulante está libre y, por tanto, disponible para los receptores. El resto está unido a proteínas que incluyen globulina de unión a corticosteroides (CBG) y albúmina.
  - Testosterona: Aproximadamente el 2-3 % de la testosterona en circulación está libre; el resto está unido a las proteínas de unión a la testosterona, incluyendo la globulina de unión a la hormona sexual. (SHBG, aproximadamente 44 %) y la globulina de unión al cortisol (CBG, aproximadamente 3,5 %), así como a albúmina (aproximadamente 50 %).
  - 30 - Dehidroepiandrosterona (DHEA). Un pequeño porcentaje de DHEA se encuentra en forma libre, aunque la mayoría está unida muy fuertemente a la globulina de unión a esteroides sexuales y unida débilmente a la globulina de unión a corticosteroides y albúmina.
  - Progesterona: Un pequeño porcentaje de progesterona se encuentra en forma libre, aunque la mayoría está unida a la globulina de unión al cortisol y a albúmina.
  - Estriol: El estriol se encuentra en forma libre o unida a las globulinas de unión a hormonas sexuales.
  - 35 - Estradiol: Aproximadamente el 1-3 % de la hormona circulante está libre, mientras que el resto está unido fuertemente a la globulina de unión a estrógenos.
- 40 b. Hormonas de esterol:
- Derivados de la Vitamina D.
  - Calcitriol.
- 45 El término hormona tiroidea hace referencia a tiroxina (T4), triyodotironina (T3), diyodotironina (T2), monoyodotironina (T1) y combinaciones de las mismas. Se entiende que las hormonas tiroideas pueden estar compuestas por sus sales, sus L o D-enantiómeros, o sus formas desyodinadas e isoméricas.
- 50 Para los fines de la presente invención se entiende que el término "analito" abarca todos los enantiómeros e isómeros de dicho analito concreto, bien mezclado o como un entorno homogéneo. Para los analitos en un fluido biológico, el analito puede originarse exógena o endógenamente. En algunas realizaciones, el analito puede estar en un fluido biológico de un primate, tal como simios, monos, orangutanes, babuinos, gibones y chimpancés, cánidos tales como perros y lobos; félidos tales como gatos, leones y tigres; équidos tales como caballos, burros y cebras, animales para alimentos tales como vacas, cerdos y ovejas; y conejos, ratones, ratas, cobayas y hurones. El analito también puede estar en un fluido de un modelo animal, por ejemplo un modelo animal de enfermedad tal como ratones, ratas u otros animales de laboratorio; un animal económicamente valioso, por ejemplo animales de cría económica importantes, animales de carreras, animales de shows, animales tradicionales, animales raros o en peligro, o animales de compañía. En particular, el analito está en un fluido biológico de un ser humano. El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se hace referencia a cualquier mamífero, incluidos humanos y no humanos, tales como, entre otros, animales domésticos, y de granja, animales de zoológico, animales para deportes y mascotas.
- 55 60 65 El agente estabilizante puede estar incorporado en un tampón reactivo o un tampón de lavado o en ambos. También puede mezclarse con un ligando de captura. En otras formas de realización, puede ser una solución aparte.

También se describe una composición para usar en un ensayo que mide la concentración de un analito, en algunas realizaciones un analito libre, comprendiendo la composición un ligando de captura y un agente estabilizante.

- 5 Los ligandos de captura son específicos del analito y pueden comprender cualquier sustancia capaz de unirse de forma selectiva al analito libre de interés. Ejemplos de ligandos de captura incluyen, entre otros, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, imitador del anticuerpo o proteína de unión específica al analito, tal como factor intrínseco o proteína de unión al folato, y combinaciones de los mismos.
- 10 Como se usa en el presente documento, con el término "anticuerpo" se pretende incluir todas las formas, tales como, entre otras, anticuerpos policlonales, monoclonales, IgG purificada, IgM purificada, IgA purificada, o combinaciones de los mismos, anticuerpos de cadena sencilla (patente de EE.UU. nº 4,946,778), anticuerpos químéricos o humanizados (Morrison et al., 1984, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851; Neuberger et al., 1984, Nature 81:6851) and complementary determining regions (CDR; see Verhoeven and Windust, in Molecular Immunology 2ed., de B. D. Hames y D. M. Glover, IRL Press, Oxford University Press, 1996, en las pág. 283-325). El término "fragmento de anticuerpo" incluye, entre otros, fragmentos tales como Fv, Fv de cadena sencilla (scFv), F(ab')<sub>2</sub>, y fragmentos Fab (Harlow y Leon, 1988, Antibody, Cold Spring Harbor). Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener mediante cualquier procedimiento convencional, tales como, entre otros, los procedimientos descritos en Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow, D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
- 15
- 20 La expresión "imitador de anticuerpo" hace referencia a sustancias químicas que simulan las funciones de anticuerpos. Los imitadores de anticuerpos son, en general, de tamaño pequeño, lo que les permite evitar provocar una respuesta inmunogénica. Existen varios enfoques de la estructura y fabricación de estos imitadores de anticuerpos, tales como estructuras de proteínas alternativas, estructuras que comprenden ARN, oligómeros no naturales, tales como benzodiazepinas, imitadores en giro meta, inhibidores de la proteasa y derivados de purinas; biopolímeros no naturales tales como oligocarbamatos, oligoureas y oligosulfonas; y la unión de varios sustituyentes a los armazones, tales como xanteno y cubano, como se describe en Hsieh-Wilson, et al., (1996) Acc. Chem Res. 29:164-170, y la patente de EE.UU. nº 5.770.380,
- 25
- 30 La expresión "factor intrínseco" hace referencia a una glicoproteína necesaria para la absorción de vitamina B<sub>12</sub>. En algunas realizaciones, la expresión "factor intrínseco" hace referencia a un factor intrínseco humano.
- 35 La expresión "proteína de unión específica de analito" puede incluir cualquier proteína que no es un anticuerpo que se une específicamente a un analito. Ejemplos de analitos con sus proteínas de unión específica a analito incluyen, entre otros: globulina de unión a tiroxina/tiroxina; inhibidor enzimático, coenzima o cofactor/enzima; cortisol/proteína de unión a cortisol; vitamina B12/factor intrínseca; y folato/proteína de unión a folato. En algunas realizaciones, la proteína de unión específica de analito es el ligando de captura. En algunas realizaciones, la proteína de unión específica de analito es la proteína de unión a folato o factor intrínseco.
- 40
- 45 En una realización, la composición de la presente invención puede comprender un ligando de captura, un agente estabilizante, y puede además comprender sales tales como sales de amonio, sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio, sales de cinc, sales cloruro, sales carboxilato, sales fosfato, sales de sulfato inorgánico o combinaciones de las mismas.
- 50
- 55 En una realización, la presente invención está dirigida a una composición para uso en un ensayo que mide la concentración de un analito. En algunas realizaciones, el analito existe como analito libre y un analito unido, y la invención está dirigida a un ensayo que mide la concentración del analito libre. La expresión "analito libre" hace referencia a un analito que no está unido, bien específica o inespecíficamente, a otra especie molecular, tales como proteínas, distinta a un ligando de captura. Por tanto, el analito libre no está asociado con otra especie molecular en el fluido. La expresión "analito unido" hace referencia a un analito que está asociado, bien específica o inespecíficamente, con otra especie molecular, tales como proteínas, distinta a un ligando de captura. En algunas realizaciones, para estabilizar la proporción entre el analito libre y el unido, la presente invención usa uno o más agentes estabilizantes que comprenden la fórmula genera RX.
- 60
- 65 El agente estabilizante puede estar presente en varias concentraciones. Al describir la concentración del agente estabilizante en el presente documento, la expresión "porcentaje en volumen" hace referencia al volumen del agente estabilizante por unidad de volumen de la composición final. La expresión "composición final" hace referencia a la composición que comprende el ligando de captura y el agente estabilizante. Por tanto, por ejemplo, si a 49 ml del tampón de lavado se añadiera 1 ml del agente estabilizante y el agente estabilizante / tampón de lavado se introdujera en 50 ml de una solución que contiene el analito y el ligando de captura, el porcentaje en volumen sería del 1% del agente estabilizante (es decir, 1 ml d agente estabilizante en 100 ml de la composición final). Los porcentajes en volumen adecuados de un agente estabilizante en una composición final incluyen, entre otros, de aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 0,5 porcentaje en volumen, de aproximadamente 0,00005 a aproximadamente 0,4 porcentaje en volumen, de aproximadamente 0,00009 a aproximadamente 0,3 porcentaje en volumen, de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,1 porcentaje en volumen, de aproximadamente 0,0002 a aproximadamente 0,2 porcentaje en volumen, o de aproximadamente 0,00015 a aproximadamente 0,15 porcentaje

en volumen, donde los porcentajes en volumen anteriores se basan en el volumen total de una composición final. Dado que la afinidad de unión de un analito por su proteína de unión específica del analito determina el equilibrio entre el analito libre y el analito unido, un experto en la técnica puede optimizar el porcentaje del agente estabilizante para un analito concreto caso por caso.

5 La concentración del agente estabilizante también se puede medir en moles de del agente estabilizante por litro de la composición final. La concentración de un agente estabilizante en una composición final puede ser, generalmente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 900 micromolar, de aproximadamente 5 a aproximadamente 850 micromolar, de aproximadamente 25 a aproximadamente 800 micromolar, de aproximadamente 40 a 10 aproximadamente 800 micromolar, de aproximadamente 5 a aproximadamente 750 micromolar, de aproximadamente 30 a aproximadamente 700 micromolar, o de aproximadamente 25 a aproximadamente 600 micromolar.

15 En realizaciones donde el agente estabilizante es EHS, la fracción en volumen de EHSA en una composición final es, en general, de aproximadamente 0,0005 a aproximadamente 0,04, de aproximadamente 0,0009 a aproximadamente 0,03, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,02, de aproximadamente 0,002 a 20 aproximadamente 0,019, de aproximadamente 0,004 a aproximadamente 0,015, o de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,01 porcentaje en volumen, donde los porcentajes en volumen anteriores se basan en el volumen total de una composición final.

25 En realizaciones donde el agente estabilizante es EHS, la concentración de EHS en una composición final puede ser, generalmente, de aproximadamente 50 a aproximadamente 800 micromolar, de aproximadamente 100 a aproximadamente 750 micromolar, de aproximadamente 150 a aproximadamente 700 micromolar, de aproximadamente 150 a aproximadamente 650 micromolar, de aproximadamente 200 a aproximadamente 600 micromolar, de aproximadamente 250 a aproximadamente 550 micromolar, o de aproximadamente 300 a 30 aproximadamente 500 micromolar.

35 Con respecto a los procedimientos de la presente invención, se entiende que el agente estabilizante puede estar presente con la mezcla de la muestra con el ligando de captura específico de analito o inmediatamente después. Por ejemplo, el agente estabilizante se puede añadir secuencialmente tras la combinación de la muestra con el ligando de captura específico de analito como componente de un tampón reactivo, un tampón de lavado o ambos.

En ciertas realizaciones, la presente invención también está dirigida a un procedimiento para medir una concentración de un analito libre, comprendiendo el procedimiento:

- 35 (a) añadir a un vaso un ligando de captura para el analito libre;  
 (b) añadir a un vaso un agente estabilizante;  
 (c) añadir al vaso una muestra que comprende el analito libre;  
 (d) añadir al vaso un sistema de detección; y  
 40 (e) medir la concentración del analito libre en la muestra usando el sistema de detección.

45 Se reconoce que las etapas del procedimiento para medir una concentración de un analito libre se pueden realizar en varios órdenes secuenciales, con la condición de que la etapa (e) debe ser la etapa final. Por tanto, por ejemplo, la etapa (b) puede preceder a la etapa (a), la etapa (c) puede preceder a la etapa (b), o ambas cosas.

50 En algunas realizaciones, el vaso puede comprender un vial, un tubo, un contenedor para una mezcla de reacción, un pocillo de una placa de microtitulación, una membrana en un sistema de flujo lateral, u otros componentes estables de un sistema de flujo de líquido.

55 La expresión "sistema de detección", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más componentes de un sistema que se sabe que detecta (bien directa o bien indirectamente) un analito.

En algunas realizaciones, el sistema de detección comprende componentes de radioinmunoensayos, ensayos de inmunosorción ligada a enzimas, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos quimioluminiscentes, inmunoensayos bioluminiscentes o inmunoensayos fluorescentes. Dichos sistemas de detección son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el sistema de detección comprende partículas paramagnéticas recubiertas con una molécula de unión específica al ligando de captura, un marcador detectable o una combinación de os mismos. En algunas realizaciones, la molécula de unión específica del ligando de captura es específica de hapteno y el ligando de captura se haptena. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el hapteno es biotina. En algunas realizaciones, la molécula de unión específica del ligando de captura se selecciona del grupo que consiste en estreptavidina, avidina, anticuerpo específico de biotina, fragmento anticuerpo específico de biotina e imitador del anticuerpo específico de biotina.

65 En algunas realizaciones, el sistema de detección comprende un marcador detectable. Como se usa en el presente documento, un "marcador detectable" tiene el significado habitual en la técnica y hace referencia a un átomo (p. ej., radionúclidos), molécula (p. ej., fluoresceína) o complejo que es o se puede usar para detectar (p. ej., debido a una

propiedad física o química) o para indicar la presencia de una molécula o para revelar la unión de otra molécula a la que está covalentemente unido o con la que se asocia. El término "marcador" también se refiere a moléculas unidas covalentemente o, de otro modo, asociadas (p. ej., una biomolécula tal como una enzima) que actúan sobre un sustrato para producir un átomo, molécula o complejo detectable. Marcadores detectables adecuados para usar en la presente invención incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, radiológicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

Marcadores útiles en la presente invención incluyen pigmentos fluorescentes (p. ej., fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína verde fluorescente, proteína fluorescente verde potenciada, lisamina, ficoeritrina, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Fluor X, SyBR Green I & II [Molecular Probes], y similares), radiomarcadores (p. ej.,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ , o  $^{32}\text{P}$ ), enzimas (p. ej., hidrolasas, en particular fosfatases tales como la fosfatasa alcalina, esterasas y glicosidases u óxidoreductasas, en particular peroxidases tales como peroxidada de rábano, y otros de uso habitual en un ELISA), sustratos, cofactores, inhibidores, grupos quimioluminiscentes, agentes cromogénicos y marcadores colorimétricos, tales como oro coloidal o cristal coloreado o perlas de plástico (p. ej., poliestireno, polipropileno y látex). Las técnicas para detectar estos marcadores se conocen bien en la técnica.

Por tanto, por ejemplo, los radiomarcadores se pueden detectar usando contadores de centelleo, los marcadores quimioluminiscentes y los marcadores fluorescentes se pueden detectar usando un fotodetector para detectar la luz emitida (p. ej., como en la clasificación de células activada por fluorescencia). Los marcadores enzimáticos normalmente se detectan proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de la reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato y los marcadores colorimétricos se detectan simplemente visualizando el marcador coloreado.

Por tanto, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, radiológicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. El marcador puede estar acoplado directa o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con los procedimientos bien conocidos en la técnica. Los marcadores no radioactivos a menudo se unen por medios indirectos. En algunas realizaciones, un marcador detectable que es detectable inherentemente o está unido covalentemente a un sistema de generación de señales tal como una enzima detectable, compuesto fluorescente o compuesto quimioluminiscente (p. ej. T4-ALP o T3-ALP en un inmunoensayo competitivo para T4 libre) compite con el analito (p. ej., T4 libre en una muestra de fluido) por la unión a ligando de captura (p. ej., anticuerpo monoclonal específico de T4). En algunas realizaciones, el ligando de captura puede estar inmovilizado directamente sobre una fase sólida. En algunas realizaciones, el ligando de captura puede estar biotinilado para la inmovilización indirecta sobre una fase sólida a través de su unión con una molécula de unión específica del ligando de captura, tal como un anticuerpo monoclonal específico de estreptavidina o biotina.

Cuando un analito tiene una molécula de unión natural específica del analito, de un modo tal que un analito se puede detectar o medir usando una forma marcada del analito o de un análogo del analito o de la molécula de unión específica del analito en un sistema de detección. En algunas realizaciones, un ligando de captura (p. ej., en anticuerpo monoclonal específico del factor intrínseco (FI) compite con el analito (p. ej., la vitamina B12) por la unión a un marcador detectable natural específico del analito (p. ej., IF-ALP en un inmunoensayo competitivo por la vitamina B12). En algunas realizaciones, el ligando de captura puede estar inmovilizado directamente sobre una fase sólida. En algunas realizaciones, el ligando de captura puede estar biotinilado para la inmovilización indirecta sobre una fase sólida a través de su unión con una molécula de unión específica del ligando de captura, tal como un anticuerpo monoclonal específico de estreptavidina o biotina. El marcador detectable es detectable de forma inherente o está unido covalentemente a un sistema generador de señal tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Dichos marcadores detectables se pueden conjugar directamente a compuestos generadores de señal, por ejemplo mediante conjugación con una enzima o fluoróforo. Las técnicas para detectar los marcadores son bien conocidas en el campo e incluyen, entre otras, el uso de un agente quimioluminiscente, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un sustrato de una reacción enzimática, un agente fluorescente o un radioisótopo. La enzima se puede seleccionar del grupo que contiene fosfatasa alcalina, amilasa, luciferasa, catalasa, beta-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa-6-deshidrogenasa, hexoquinasa, peroxidada de rábano, lactamasa, ureasa y malato deshidrogenasa. El sustrato comprende los grupos moleculares mediante los cuales se sabe que actúan los marcadores precedentes.

En algunas realizaciones de la presente invención, el ligando de captura se inmoviliza sobre una fase sólida. Una fase sólida puede estar comprendida por una superficie de acoplamiento a proteína que incluye, por ejemplo, una placa de microutilitación, una partícula de metal coloidal, una partícula de óxido de hierro, una perla polimérica, nanopartículas o micropartículas. Además, la fase sólida puede estar comprendida por agregados químicos o moleculares que funcionan como fase sólida en un sistema de separación (p. ej., fraccionación, precipitación o centrifugación).

En ciertas realizaciones, la presente invención también está dirigida a un kit para uso en la estimación de una concentración de un analito libre, comprendiendo el kit:

- 65 (a) un ligando de captura para el analito libre;

- (b) un agente estabilizante; y
- (c) un sistema de detección.

5 En algunas realizaciones, el kit comprende además (d) un patrón de referencia. Se pueden usar varios patrones de referencia en función del analito de interés. En general, el patrón de referencia comprende un analito o su análogo que tiene una concentración conocida y se usa para estimar la concentración del analito concreto que se va a medir. El patrón de referencia puede comprender un analito purificado, un analito recombinante, nativo o sintético, un fármaco, una hormona o una vitamina. La porción de matriz de una matriz del patrón de referencia comprende un fluido biológico o sintético que puede aproximar el entorno del analito en la muestra que se va a medir.

10 10 En una realización concreta, la presente invención mejora la precisión de los ensayos que miden concentraciones de hormonas tiroideas libres no unidas a proteínas usando 2-etilhexilsulfato (EHS) y/o compuestos relacionados como agente estabilizante. La presente invención mejora además la precisión diagnóstica de la medición de la porción biodisponible o libre de hormonas tiroideas presentes en el fluido corporal de un sujeto. La mejora de las mediciones precisas de la concentración se produce estabilizando el equilibrio de la hormona libre no unida a proteína y de la hormona unida a proteína inherente en un fluido corporal, tal como suero o plasma.

15 15 En la presente realización, la presente invención usa moléculas pequeñas sulfonatadas o sulfatadas como componente de sal aniónica del agente estabilizante. Tradicionalmente, los sulfatos o sulfonatos, tales como 8-anilino naftaleno-1-sulfonato (ANS), se usan para desplazar los analitos unidos a la proteína con el fin de medir la hormona total (unida más libre). Por tanto, cabe esperar la inclusión de moléculas con grupos sulfonato o sulfato en la composición como agentes estabilizantes tenga como resultado un incremento artificial de la fracción de hormona libre o un error diagnóstico por demasiada muestra. Por tanto, la presente invención es inesperada.

20 20 25 En la presente realización, los tensioactivos o no tensioactivos con grupos sulfonato o sulfato mejoran la consistencia de los inmunoensayos mediante la adición a la reacción de ensayo como agentes estabilizantes. Sin desear quedar limitado a teoría alguna, se ha postulado que el mecanismo para permitir mediciones precisas de la concentración de las hormonas tiroideas libres es mediante la estabilización del equilibrio entre hormona libre y hormona unida a través de la adición de EHSA u otros sulfatos o sulfonatos aniónicos de cadena pequeña (6 a 18 carbonos), al principio de la reacción. Entre las diversas sustancias químicas sulfatadas o sulfonatadas, aquellas con sulfatos o sulfonatos estéricamente disponibles actúan como agentes estabilizantes adecuados. En algunas realizaciones, otros factores importantes para agentes estabilizantes adecuados se describen mediante la fórmula general RX, donde R comprende un hidrocarburo de cadena corta (que confiere la hidrofobicidad a un extremo de la molécula) y donde X comprende un grupo hidrofílico pequeño, por ejemplo un grupo químico pequeño que contiene más de un átomo de oxígeno. Las FIGS. 1 y 2 ilustran, sin desear que sean imitantes, algunos de los diversos grupos R y grupos X que se pueden combinar para formar un agente estabilizante de la presente invención.

30 30 35 En una la realización de la presente invención, el analito es una hormona tiroidea. Los siguientes son puntos de interés a observar sobre las hormonas tiroideas.

40 40 45 50 55 60 65 1. La tiroxina (T4) es una hormona esencial producida por la glándula tiroidea. La triiodotironina (T3) se puede liberar directamente desde la tiroglobulina en la glándula tiroideas, pero la mayoría de la T3 se fabrica en otras partes del cuerpo mediante desyodinación de la tiroxina.

2. Mediante una reacción con la enzima tiroperoxidasa, el yodo se une covalentemente a residuos de tirosina en las moléculas de tiroglobulina, formando monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT). La tiroxina se produce uniendo dos restos de DIT. Combinando una molécula de MIT y una molécula de DIT se produce triyodotironina. MIT y DIT se forman in situ en la tiroglobulina como precursores inactivos de las hormonas T4 y T3. Las proteasas en los lisosomas digieren la tiroglobulina yodinada, liberando T3 y T4. MIT y DIT también son productos de la proteólisis, pero se degradan in situ mediante la yodotirosina deshalogenasa.

3. Otros constituyentes de la glándula tiroidea, además de T4 y T3, incluyen la diyodotironina (T2) y la monoyodotironina (T1).

4. Las tironaminas son metabolitos descarboxilados y desyodinados de las hormonas tiroideas tiroxina (T4) y 3,5,3'-tryiodotironina (T3).

5. Las células foliculares en la glándula tiroidea sintetizan las hormonas tiroideas que contienen yodo, T4 y T3, las células parafoliculares de glándula tiroidea producen calcitonina, una hormona peptídica de 32 aminoácidos escindida del polipéptido más grande procalcitonina.

La tiroxina (T4), la triiodotironina (T3), la diyodotironina (T2) y la monoyodotironina (T1) en sangre se pueden unir a las proteínas en suero y, por tanto, es posible que solo una fracción se distribuya en la forma libre no unida a proteínas, conocida por otro lado como la porción biodisponible. Esta cantidad libre aumenta o disminuye en un estado de enfermedad tiroidea de un sujeto. Por ejemplo, en el hipotiroidismo, la fracción libre no unida a proteínas en sangre disminuye, mientras que en el hipertiroidismo la fracción libre no unida a proteínas es elevada.

La prueba de la tiroxina libre (FT4) se usa como medición directa de la función tiroidea y habitualmente es requerida por los médicos como seguimiento, o junto con, la hormona estimulante del tiroides (TSH) con el fin de determinar si el estado tiroideo de un sujeto es eutiroideo (función tiroidea sana), hipotiroido o hipertiroido. No obstante, es más

habitual encontrar pruebas de FT4 que llevan a error que mediciones de TSH que lleven a error debido a las dependencias de las proteínas de unión inherentes a todas las hormonas tiroideas libres no unidas a proteínas y de otros factores de dependencia que pueden alterar el equilibrio entre hormona libre y unida. Por tanto, es importante incluir un agente estabilizante para estabilizar la FT4 cuando se ensaya una muestra de un sujeto para determinar la función tiroidea adecuada.

- 5 En una realización de la presente invención, el agente estabilizante se añade al ensayo antes de añadir la muestra que contiene el analito. En otras realizaciones, el agente estabilizante se puede añadir al ensayo después de la muestra que contiene el analito, por ejemplo como parte de un tampón reactivo. En algunas realizaciones, el agente estabilizante es una parte del kit de reactivos que contiene un ligando de captura (p. ej., un anticuerpo específico de analito). En algunas realizaciones, el agente estabilizante de la presente invención se puede añadir a un ensayo específico de analito, por ejemplo un ensayo FT4, de varios modos. Por ejemplo, el agente estabilizante se puede añadir por medio de un sistema de viales, un sistema de tampones o un sistema de envases. En el sistema de viales, el agente estabilizante, por ejemplo uno o más compuestos sulfonatados, se añade a la mezcla de reacción desde viales. En el sistema de tampones, el agente estabilizante, por ejemplo uno o más compuestos sulfonatados, es parte de una solución de tampón de lavado que se añade a la mezcla de reacción. En el sistema de envases, el agente estabilizante, por ejemplo uno o más compuestos sulfonatados, se toma del pocillo del envase de reactivos que contiene el anticuerpo específico del analito y se añade al vaso que contiene la mezcla de reacción.
- 10 20 El sistema de ensayo Access FT4 de BCI (BCI, Fullerton, CA) se usa para medir la concentración de la tiroxina libre no unida a proteínas en el suero o plasma de sujetos. Este ensayo se desarrolló primero usando un fluorotensioactivo de alquilamina en la solución de lavado. La solución de lavado se usó como purga de la sonda después de liberar los reactantes del ensayo y también como solución de lavado. La presente invención se desarrolló con el fin de sustituir el tensioactivo solución de lavado con un tensioactivo hidrocarburo más ecológico. La composición de la presente invención puede contener, entre otros, proteínas, tensioactivo, iones tampón y composiciones salinas que no alteran significativamente el equilibrio de las porciones de tiroxina unidas a proteínas y libres no unidas a proteínas en suero o en plasma. Las proteínas de unión a tiroxina están comprendidas por albúmina, globulina de unión a tiroxina y transtiretina.
- 15 25 30 35 40 En una realización de la presente invención, EHAS es el agente estabilizante y se titula dentro de un intervalo de concentraciones optimizado, en el caso de FT4 entre aproximadamente 0,002% en volumen/volumen y de aproximadamente 0,015% en volumen/volumen, preferentemente a 0,004% en volumen/volumen (o 181 micromolar) en la composición de reacción final, para ayudar al mantenimiento del equilibrio entre porción libre y unida. Los ejemplos siguientes de cómo usar la presente invención puede exponer una o más, aunque no todas, realizaciones de ejemplo de la presente invención como contemplan los inventores y, por tanto, no están destinados a limitar de ningún modo la presente invención y el alcance de las reivindicaciones.

### Ejemplos

- 45 50 55 60 65 El ensayo Access Free T4 assay (BCI) es un inmunoensayo enzimático de dos etapas- A un vaso de reacción se añade anticuerpo monoclonal anti-tiroxina (T4) (BCI) acoplado a biotina, una muestra biológica que contiene T4, una solución de proteína tamponada que contiene agente estabilizante y la fase sólida recubierta con estreptavidina. Durante esta primera incubación, el anticuerpo anti-T4 acoplado a biotina se une a la fase sólida y la T4 libre en la muestra. Tras incubar en un vaso de reacción, los materiales unidos a la fase sólida son retenidos en un campo magnético mientras que los materiales no unidos se eliminan mediante lavado. Después, al vaso de reacción se añaden solución de proteína tamponada y conjugado de fosfatasa alcalina-triyodotironina (T3).
- El conjugado fosfatasa alcalina-T3 se une a los sitios de unión del anticuerpo anti-T4 vacíos. Tras incubar en un vaso de reacción, los materiales unidos a la fase sólida son retenidos en un campo magnético mientras que los materiales no unidos se eliminan mediante lavado. Después, al vaso se añade el sustrato quimioluminiscente Lumi-Phos®530 (Lumigen Inc., Southfield, MI) y la luz generada por la reacción se mide con un luminómetro. La producción de luz es inversamente proporcional a la concentración de T4 libre en la muestra. La cantidad de analito en la muestra se determina a partir de una curva de calibración de varios puntos almacenada. Suero y plasma (heparina) son las muestras recomendadas.
- El kit de ensayo Access Free T4 A33070A de BCI incluye un envase de reactivo Access Free T4 Reagent Pack nº de cat. 33880: 100 determinaciones, 2 envases, 50 pruebas/envase. Se proporciona listo para usar. El envase de reactivo contiene los siguientes reactivos A a E:
- Reactivo A: Partículas paramagnéticas Dynabeads® con estreptavidina en tampón TRIS con proteína (aves), tensioactivo, 0,125 % de NaN<sub>3</sub> y 0,125% de ProClin® 300 (disponible en Rohm and Haas, Philadelphia, PA).
- Reactivo B: Solución salina tamponada con Tris con proteína (aves), tensioactivo, < 0,1 % de NaN<sub>3</sub> y 0,1 % de ProClin 300,

- Reactivos C: Solución salina tamponada con Tris con proteína (aves), tensioactivo, < 0,125 % de NaN<sub>3</sub> y 0,125 % de ProClin 300,
- 5 Reactivo D: Conjugado triiodotironina-fosfatasa alcalina (bovina) en un tampón Tris con proteína (aves), tensioactivo, < 0,1 % de NaN<sub>3</sub> y 0,1 % de ProClin 300,
- 10 Reactivo E: Anti-tiroxina (T4) monoclonal de ratón acoplado a biotina en un tampón Tris con proteína (aves y murina), tensioactivo y agente estabilizante, < 0,125 % de NaN<sub>3</sub> y 0,125 % de ProClin 300,
- 15 EJEMPLO 1
- Solo agente estabilizante en el reactivo E del envase de reactivos
- 20 La primera reacción comprende las siguientes adiciones secuenciales al vaso de reacción.
- 25     1) 50 µl de Reactivo E (que contiene agente estabilizante,, por ejemplo 0,016 % de EHS);  
      2) 30 µl de la muestra que contiene analito;  
      3) 30 µl del tampón de lavado del sistema (que no contiene agente estabilizante);  
      4) 30 µl del reactivo B (que no contiene agente estabilizante);  
      5) 50 µl de Reactivo A.
- 30 Tras la incubación y lavados del vaso de reacción, la segunda reacción comprende las siguientes adiciones secuenciales al vaso de reacción:  
    6) 220 µl de Reactivo C;  
    7) 50 µl de Reactivo D;  
    8) 80 µl del tampón de lavado del sistema (que no contiene agente estabilizante).
- 35 Tras la incubación y lavados del vaso de reacción, la concentración del analito libre en la muestra se mide usando el sistema de detección.
- EJEMPLO 2
- 35 Solo agente estabilizante en el reactivo B del envase de reactivos
- La primera reacción comprende las siguientes adiciones secuenciales al vaso de reacción.
- 40     1) 50 µl del reactivo E (que no contiene agente estabilizante);  
      2) 30 µl de la muestra que contiene analito;  
      3) 30 µl del tampón de lavado del sistema (que no contiene agente estabilizante);  
      4) 30 µl de Reactivo B (que contiene agente estabilizante,, por ejemplo 0,016 % de EHS);  
      5) 50 µl de Reactivo A.
- 45 Tras la incubación y lavados del vaso de reacción, la segunda reacción comprende las siguientes adiciones secuenciales al vaso de reacción:  
    6) 220 µl de Reactivo C;  
    7) 50 µl de Reactivo D;  
    8) 80 µl del tampón de lavado del sistema (que no contiene agente estabilizante).
- 50 Tras la incubación y lavados del vaso de reacción, la concentración del analito libre en la muestra se mide usando el sistema de detección.
- EJEMPLO 3
- 55 Solo agente estabilizante en el reactivo F del sistema de viales
- La primera reacción comprende las siguientes adiciones secuenciales al vaso de reacción.
- 60     1) 50 µl del reactivo E (que no contiene agente estabilizante);  
      2) 30 µl de la muestra que contiene analito;  
      3) 30 µl del Vial Reagent F (que contiene tampón de lavado con al menos uno de los agentes estabilizantes a los que se hace referencia en la FIG. 3 o la FIG. 4);  
      4) 30 µl del reactivo B (que no contiene agente estabilizante);  
      5) 50 µl de Reactivo A.
- 65 Tras la incubación y lavados del vaso de reacción, la segunda reacción comprende las siguientes adiciones secuenciales al vaso de reacción:

6) 220 µl de Reactivo C;

7) 50 µl de Reactivo D;

8) 80 µl del Vial Reagent F (que contiene tampón de lavado con al menos uno de los agentes estabilizantes a los que se hace referencia en la FIG. 3 o la FIG. 4).

5

Tras la incubación y lavados del vaso de reacción, la concentración del analito libre en la muestra se mide usando el sistema de detección.

EJEMPLO 4

10

Solo agente estabilizante en el tampón de lavado del sistema

La primera reacción comprende las siguientes adiciones secuenciales al vaso de reacción.

15

1) 50 µl del reactivo E (que no contiene agente estabilizante);

2) 30 µl de la muestra que contiene analito;

3) 30 µl del tampón de lavado del sistema en una matriz salina tal como TRIS 20mM, NaCl 0,15M, 0,1 % de Proclin 300, 0,1 % de NaN3, a pH 8.0, que contiene al menos un agente estabilizante tal como EHS u otros tensioactivos sulfonatados como se hace referencia en la FIG. 3 o la FIG. 4;

20

4) 30 µl del reactivo B (que no contiene agente estabilizante);

5) 50 µl de Reactivo A.

Tras la incubación y lavados del vaso de reacción, la segunda reacción comprende las siguientes adiciones secuenciales al vaso de reacción:

25

6) 220 µl de Reactivo C;

7) 50 µl de Reactivo D;

8) 80 µl del tampón de lavado del sistema en una matriz salina tal como TRIS 20mM, NaCl 0,15M, 0,1 % de Proclin 300, 0,1 % de NaN3, a pH 8.0, que contiene al menos un agente estabilizante tal como EHS u otros tensioactivos sulfonatados como se hace referencia en la FIG. 3 o la FIG. 4.

30

Tras la incubación y lavados del vaso de reacción, la concentración del analito libre en la muestra se mide usando el sistema de detección.

Estos ejemplos ilustran posibles realizaciones de la presente invención. El alcance y ámbito de la presente invención no debe estar limitado por ninguna de las realizaciones de ejemplo descritas anteriormente, pero se definirán únicamente de acuerdo con las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para medir una concentración de una hormona tiroidea libre, donde la hormona tiroidea existe en un equilibrio entre las formas libre y unida en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

- 5       (a) añadir en un vaso un ligando de captura para la forma libre de la hormona tiroidea;
- (b) añadir un agente estabilizante, o una sal del mismo, en el vaso, donde el agente estabilizante comprende la fórmula general RX,
- 10      donde R es alquilo C<sub>6-18</sub> y X es sulfato, ácido sulfónico o sulfonato, y donde el agente estabilizante conserva un equilibrio entre las formas libre y unida de la hormona tiroidea; y donde el agente estabilizante está presente a una
- 15      (i) concentración de 1 a 900 micromolar,
- (ii) concentración de 5 a 850 micromolar,
- (iii) concentración de 25 a 800 micromolar,
- (iv) concentración de 40 a 800 micromolar,
- (v) concentración de 5 a 750 micromolar,
- (vi) concentración de 30 a 700 micromolar,
- (vii) concentración de 25 a 600 micromolar.
- 20      (c) añadir al vaso la muestra que comprende la hormona tiroidea;
- (d) añadir al vaso un sistema de detección; y
- (e) medir la concentración de la hormona tiroidea libre en la muestra usando el sistema de detección.
- 25      2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el agente estabilizante es 2-etilhexilsulfato o una sal del mismo.
- 30      3. El procedimiento de la reivindicación 2, donde el 2-etilhexilsulfato o una sal del mismo, está presente a una
- (a) concentración de 50 a 800 micromolar,
- (b) concentración de 100 a 750 micromolar,
- (c) concentración de 150 a 700 micromolar,
- (d) concentración de 150 a 650 micromolar,
- (e) concentración de 200 a 600 micromolar,
- (f) concentración de 250 a 550 micromolar, o
- (g) concentración de 300 a 500 micromolar.
- 35      4. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la hormona tiroidea es tiroxina (T4).
- 40      5. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el ligando de captura es específico del analito y se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo, fragmento de anticuerpo, imitador de anticuerpo, proteína de unión específica del analito y combinaciones de los mismos.
- 45      6. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el sistema de detección comprende una fase sólida recubierta con una molécula de unión específica al ligando de captura, un marcador detectable o una combinación de os mismos.
- 50      7. El procedimiento de la reivindicación 6, donde la fase sólida es una partícula paramagnética.
- 8. El procedimiento de la reivindicación 6, donde la molécula de unión específica del ligando de captura es
- (a) específica de hapteno y donde el ligando de captura está haptenado, preferentemente donde el hapteno es biotina; o
- (b) seleccionado del grupo que consiste en estreptavidina, avidina, anticuerpo específico de biotina, fragmento anticuerpo específico de biotina e imitador del anticuerpo específico de biotina.
- 55      9. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el ligando de captura se inmoviliza sobre una fase sólida.

60

65

**FIG. 1** Varios grupos R para formar agentes estabilizantes que comprenden la fórmula general RX

GRUPO R	
Categoría	Grupos químicos tales como
I. Alquilo O arilo	Alquilo y arilo lineal y ramificado Homólogos de olefinas con uno o más carbonos insaturados a enlaces de carbono Derivados cíclicos y policíclicos de alquilo y arilo Derivados heterocíclicos de alquilo y arilo Derivados de alquilo y arilo con halógeno, Si, O, N y/o P Derivados hidroxi, éster, éter, carboxi, amina, óxido de amina y amida de alquilo y arilo Derivados fosfato,a cegato, carboxilato y amonio de alquilo y arilo Derivados aniónicos, catiónicos y no iónicos de alquilo y arilo Derivados de alquilo y arilo
II Ácido graso	Ácidos grasos y homólogos Ésteres de ácidos grasos Derivados alcanolamida de ácidos grasos Ácido graso oxioetilado Derivados no iónicos, aniónicos y catiónicos de ácidos grasos Derivados de ácidos grasos con halógeno, Si, O, N y/o P Derivados de ácidos grasos
III Alcohol	Alcoholes Alquilfenol y derivados Ésteres de alcoholes Derivados de alcoholes y fenoles con halógeno, Si, O, N y/o P Derivados de hidrocarbonos de alcoholes
IV. Éster	Ésteres, poliésteres, ésteres de sorbitano, ésteres de azúcar Derivados de hidrocarbonos de ésteres Derivados no iónicos, aniónicos y catiónicos de ésteres Derivados de ésteres
V. Éter	Grupos hidrocarbonos que comprenden un enlace éter Derivados no iónicos, aniónicos y catiónicos de éteres Derivados de étesres Políeteres, éteres de fenol, éteres corona
VI. Aminas	Poliaminas, óxidos de amina, aminas etoxiladas y otros derivados de amina
VII. Oxialquilato	Polioxietileno, polioxipropileno, polibutileno y estructuras relacionadas, así como sus copolímeros de bloque Derivados oxialquilados con cadena hidrocarburo Copolímeros oxietilados con otros restos orgánicos o inorgánicos Derivados oxialquilados y copolímeros con halógeno, N y/o P Derivados catiónicos, aniónicos, no iónicos de restos oxialquilados
VIII. Siloxano	Siloxano lineal, ramificado y cíclico Estructuras químicas con estructura de carbosilano Siloxano y estructuras de carboxilano con cadenas laterales de hidrocarbonos Copolímeros de silicona con poliéter, poliéster, poliol, poliaminas, poliuretano y otros restos poliméricos Organosiliconas Sal de amonio de siloxanos y carbosilanos Derivados no iónicos, aniónicos y catiónicos de siloxano y carbosilano Derivados no iónicos, aniónicos y catiónicos de siloxanos Derivados de siloxanos

**FIG. 2** Los grupos R para formar agentes estabilizantes que comprenden la fórmula general RX  
GRUPO X

Categoría	Grupos químicos tales como
I. Un grupo que contiene azufre	Sulfato, ácido sulfónico, sulfonato, sulfito, sulfóxido (-SO, -SO <sub>2</sub> ), taurato, sulfosuccinato, sulfobetaína, sulfonamida, metoximetanilamida u otros grupos funcionales que contienen sulfato, sulfonato y ácido sulfónico
II Un grupo que contiene halógeno	Clorito, cloruro, cloro, yoduro yodato, yodo, bromuro, bromo, flúor o fluoruro
III Un grupo que contiene nitrógeno	Nitrato, nitrito, amida, amina o derivado de amina (p. ej., amina cuaternario)
IV. Un grupo que contiene fósforo	Fosfato, fosfito, u otras formas reducidas de fosfato
V. Un grupo que contiene carbono	Carboxilato, acrilato, sebacato, ftalato o acetato
VI. Un grupo que contiene oxígeno	Óxido
VII. Un grupo que contiene boro	Borato
VIII. Un grupo que contiene silicio	Silano o silicato

**FIG. 3.** Gráfico que ilustra varias sustancias químicas RX evaluadas como agentes estabilizantes divulgados en la presente invención

<b>Nombre comercial</b>	<b>Sulfato/sulfonato</b>	<b>Conc. de trabajo</b>	<b>Nombres químicos</b>	<b>Cola</b>	<b>Cabeza</b>
Aerosol OR	Sí	0,05%	Diocil sulfisuccinato sódico	C8(2)	Sulfosuccinato
Alkamuls 719	No	Ninguna	PEG-30 aceite de ricino	C18(9-eno, 12-OH)	POE(30)
Alkamuls EL620	No	Ninguna	PEG-30 aceite de ricino	C18(9-eno, 12-OH)	POE(40)
Cloruro de benzalconio	de	No	Cloruro de benzalconio (C8-C18)	Benzalquilo C8-18	Amina
BioTerge AS40	Sí	0,1	Sulfonato de olefina sódica (C14-C16)	C4-16	Sulfonato
Brij 30	No	Ninguna	Polioxietilen (4) lauriléter	C12	POE(4)
Brij 35	No	Ninguna	Polioxietilen(23) dodeciléter	C12	POE(23)
Brij 700	No	Ninguna	Polioxietilen(100) esteariléter	C18(9-eno, 12-OH)	<b>POE(100)</b>
Brij 700	No	Ninguna	Polioxietilen (2) lauriléter	C18(9-eno)	<b>POE(2)</b>
Brij 92	No	Ninguna	Polioxietilen (2) oleiléter	C18(9-eno)	<b>POE(20)</b>
Brij 98	No	Ninguna	Polioxietilen (2) oleiléter	PPO(30)	<b>POE(75)X2</b>
Chemal BP-264	No	Ninguna	Copolímero de bloque alcoxilado	C12	<b>POE(9)</b>
Chemal LA-9	No	Ninguna	Polioxietilen (9) alcohol laurílico	C18(9-eno, 12-OH))	POE
Cremophor EL	No	Ninguna	Aceite de ricino polioxietilado (35)	Mezcla de alquilo	Glucosa
Eluyente	No	Ninguna	Alquilglucósidos	C12	Dimetiglicina
Empigen BB	No	Ninguna	N-dodecyl-N,N-dimetilglicina		
FC100 (como control)	Sí	0,2	(véase el párrafo [0041])		
FC100	Sí	0,5	(una forma más pura de FC 100 de 3M)		
Forafac 1157	No	Ninguna	Perfluoroalquilo betaina	Fluorocarbono (C6)	Betaina
Geropon T77	Sí	0,1	N-oleil-N-metiltaurato, sal de Na	C18(9-ene)	Taurato
Igepal CA210	No	Insol	Polioxieteleno(2)isooctifeniléter	C8-fenol	POE (2)
Myrij 45	No	Insol	Estearato de polioxétieno(8)	C18	POE(8)
Myrij 52	No	Ninguna	Estearato de polioxétieno(40)	C18	POE (40)
Myrij 53	No	Ninguna	Estearato de polioxétieno(50)	C18	POE (50)
Myrij 59	No	Ninguna	Estearato de polioxétieno (100)	C18	POE (100)
Colato Na	No	Ninguno	Colato sódico	Esteróide	Colato
Desoxicolato Na	No	Ninguno	Desoxicolato sódico	Esteróide	Desoxicolato
Ninato 411	Sí	Ninguna, insolubrē	Amina alquilbeceno sulfonato	alquilbenceno	Sulfonato
Pluronic 17R4	No	Ninguna	Copolímero de bloque de oxipropileno)	PPO (aprox. 3000	POE
Pluronic F108	No	Ninguna	Copolímero de bloque de oxipropileno)	PPO (54)	POE 80%

**FIG. 3.** Gráfico que ilustra varias sustancias químicas RX evaluadas como agentes estabilizantes divulgados en la presente invención

Nombre comercial	Sulfato/sulfonato	Conc. V/V%	de trabajo	Nombres químicos	Cola	Cabeza
Pluronic F127	No	Ninguna	Copolímero de oxipropileno)	poli(oxietilen-co-oxipropileno)	PPO (aprox. 1800)	POE 70%
Pluronic F68	No	Ninguna	Copolímero de oxipropileno)	poli(oxietilen-co-oxipropileno)	PPO (30)	POE(75) X 2
Pluronic F88	No	Ninguna	Copolímero de oxipropileno)	poli(oxietilen-co-oxipropileno)	PPO (aprox. 2400)	POE
Pluronic L121	No	Insoluble	Copolímero de oxipropileno)	poli(oxietilen-co-oxipropileno)	PPO (aprox. 3600)	POE 10%
Pluronic L31	No	Ninguna	Copolímero de oxipropileno)	poli(oxietilen-co-oxipropileno)	PPO (aprox. 900)	POE 10%
Pluronic L43	No	NINGUNA	Copolímero de oxipropileno)	poli(oxietilen-co-oxipropileno)	PPO	POE
Pluronic L44	No	NINGUNA	Copolímero de oxipropileno)	poli(oxietilen-co-oxipropileno)	PPO	POE
Pluronic L62	No	NINGUNA	Copolímero de oxipropileno)	poli(oxietilen-co-oxipropileno)	PPO (aprox. 1800, 30)	POE(7) X 2
Pluronic L64	No	NINGUNA	Copolímero de oxipropileno)	poli(oxietilen-co-oxipropileno)	PPO (30)	POE 40%
Pluronic L65	No	NINGUNA	Copolímero de oxipropileno)	poli(oxietilen-co-oxipropileno)	PPO	POE
Pluronic 105	No	NINGUNA	Copolímero de oxipropileno)	poli(oxietilen-co-oxipropileno)	PPO (54)	POE 50%
Rhodamox LO	NO	Ninguna	Oxido de lauramina		C12	N-óxido
Rhodamox BOS (=EHS)	SÍ	0,05	Sulfato de 2-ethylhexilo, Na		C6(2-C2)	Sulfato
Rhodasurf ON-780	No	Ninguna	Alcohol oleico polietoxilado (20)	C18 (9-eno)	POE (20)	
Dodecisulfato sódico	Sí	0,1	Dodecisulfato sódico	C12	Sulfato	
Silwet L7600	No	Ninguna	Polidimethylsiloxano metoxietoxilato	Dimetilsiloxano	Metiletoxilato	
Span 60	No	Insol	Monotestearato de sorbitano	C18	Sorbitano	
Standapol-ES-1	Sí	0,1	Polioxietileno (1) laurilsulfato sódico	C12	POE, sulfato	
Tensioactivo 10G	NO	Ninguna	P-isondonifenoxypolí(glicidol)	C9-fenol	PPO	
Surfynol 485	No	Ninguna	2,4,7,9-tetrametil-5-deceno-4,7-diol etoxilato (10)	C10(5-ino, ramificado)	POE(10)	
Surfynol 485	No	Ninguna	2,4,7,9-tetrametil-5-deceno-4,7-diol etoxilato (10)	C10(5-ino, ramificado)	POE(30)	

**FIG. 3.** Gráfico que ilustra varias sustancias químicas RX evaluadas como agentes estabilizantes divulgados en la presente invención

Nombre comercial	Sulfato/sulfonato	Conc. V/V%	de trabajo	Nombres químicos	Cola	Cabeza
Tetronic 1307	No	Ninguna	Etoxilato (30)	PPO	POE	
Tetronic 174	No	Ninguna	Copolímero de etilendiamina alcoxilato	PPO	POE	
Tetronic 701	No	Ninguna	Copolímero de etilendiamina alcoxilato	PPO	POE	
Tetronic 904	No	Ninguna	Copolímero de etilendiamina alcoxilato	PPO	POE	
Tetronic 90R4	No	Ninguna	Copolímero de etilendiamina alcoxilato	PPO	POE	
Triton X100	No	Ninguna	Octilfenoxipoliétileno(9-10)etanol	C8-fenol	POE (9-10)	
Triton X305	No	Ninguna	Octilfenoxipoliétileno(9-10)etanol	C8-fenol	POE (30)	
Triton X45	No	Ninguna	Octilfenoxipoliétileno(9-10)etanol	C8-fenol	POE (5)	
Tween 20	No	Ninguna	Monolaurato de polioxietileno(20) sorbitano	C12	POE (20)	sorbitano
Tween 40	No	Ninguna	Monopalmitato de polioxietileno(20) sorbitano	C16	POE (20)	sorbitano
Tween 60	No	Ninguna	Monoestearato de polioxietileno(20) sorbitano	C18	POE (20)	sorbitano
Tween 65	No	Insol	Triestearato de polioxietileno(20) sorbitano	C18 x 3	POE (20)	sorbitano
Tween 80	No	Ninguna	Monoleato de polioxietileno(20) sorbitano	C18 (9-eno)	POE (20)	sorbitano
Tween 85	No	Insol	Trioleato de polioxietileno(20) sorbitano	C18 (9-eno) x 3	POE (20)	sorbitano
Zonyl FFS300	Sí	Ninguna	Fluorocarbono no iónico	Fluorocarbono (C6)	OE	
Zonyl FFS62	Sí	0,05	F(CF <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -SO <sub>3</sub> (H, NH <sub>4</sub> )	Fluorocarbono (C6)	Sulfonato	
Zonyl FSK	No	Ninguna	Politetrafluoroetileno acetoxipropilbetaína	Fluorocarbono	Betaína	
Zonyl FSN	No	Ninguna	F(CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> )[1- <sub>9</sub> ]CH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )[0-25]H	Fluorocarbono C2-C18	POE (1-26)	
Zonyl FSO	No	Ninguna	F(CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> )[1- <sub>9</sub> ]CH <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )[0-25]H	Fluorocarbono C2-C14	POE (1-16)	
Zonyl TBS	Sí	0,1	F(CF <sub>2</sub> CF <sub>2</sub> ) <sub>[3-8]</sub> -CH <sub>2</sub> <sub>2</sub> -SO <sub>3</sub> (H, NH <sub>4</sub> )	Fluorocarbono C2-C16	Sulfonato	
Zwittergent 3-08*	No	Ninguna	N-octil-N,N-dimetil-3-amino-1-propanosulfonato	C8	Sulfobetáína	
Zwittergent 3-10*	No	Ninguna	N-deci-N,N-dimetil-3-amino-1-propanosulfonato	C10	Sulfobetáína	

**FIG. 3.** Gráfico que ilustra varias sustancias químicas RX evaluadas como agentes estabilizantes divulgados en la presente invención

<b>Nombre comercial</b>	<b>Sulfato/sulfonato</b>	<b>Conc. V/V%</b>	<b>de trabajo</b>	<b>Nombres químicos</b>	<b>Cola</b>	<b>Cabeza</b>
Zwittergent 3-12*	No	Ninguna		N-dodecil-N,N-dimetil-3-amino-1-propanosulfonato	C12	Sulfobetaina
Zwittergent 3-14*	No	Ninguna		N-tetradecil-N,N-dimetil-3-amino-1-propanosulfonato	C14	Sulfobetaina
Zwittergent 3-16*	No	Ninguna		N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amino-1-propanosulfonato	C16	Sulfobetaina

\*Estas concentraciones son las concentraciones en Vial Reagent F.

**FIG. 4:** Gráfico que ilustra varios homólogos de EHSA evaluados como agentes estabilizantes divulgados en la presente invención

<b>Nombres químicos</b>	<b>Sulfato/sulfonato</b>	<b>Conc. de trabajo VN%**</b>	<b>Cabeza</b>	<b>Cola</b>
Sulfato potásico	Sí	Ninguna		Sulfato
Sulfonato de butilo	Sí	Ninguna	Butilo	Sulfonato
Bencisulfonato	Sí	Ninguna	Bencilo	Sulfonato
Ácido 1-pentanosulfónico, sal de Na	Sí	1%	Pentilo	Sulfonato
Ácido 1-hexanosulfónico, sal de Na	Sí	1%	Hexilo	Sulfonato
Ácido 1-heptanosulfónico, sal de Na	Sí	1%	Heptilo	Sulfonato
Ácido 1-octanosulfónico, sal de Na	Sí	1%	Octilo	Sulfonato
Ácido 1-decanosulfónico, sal de Na	Sí	Ninguna, insoluble a 0.5% y a 1%	Dodecilo	Sulfonato

\*\*\*Estas concentraciones son las concentraciones en Vial Reagent F.