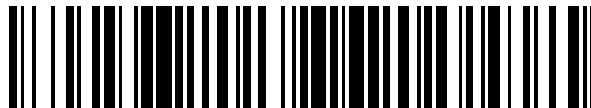


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 902**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2003** **E 03760946 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 1542013**

54 Título: **Potenciador de quimioluminiscencia**

30 Prioridad:

24.06.2002 JP 2002183720

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.07.2016

73 Titular/es:

FUJIREBIO INC. (100.0%)
2-1-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku
Tokyo 163-0410, JP

72 Inventor/es:

MORIYAMA, KAZUSHIGE;
TANIMOTO, TETSUJI;
MATSUNO, TATSUKI y
ASHIHARA, YOSHIHIRO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 575 902 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

Potenciador de quimioluminiscencia

Campo técnico

La presente invención se refiere a un inmunoensayo en fase sólida.

5 Antecedentes de la Técnica

En el campo de la medida de componentes en trazas, particularmente en el campo de diagnóstico clínico, se utilizan métodos de medición que aplican los principios de inmunología e inmunoensayos que emplean portadores sólidos finos como fase sólida son ampliamente utilizados. Los portadores sólidos finos incluyen eritrocitos, partículas de gelatina, partículas de látex y similares, y un análisis cuantitativo se realiza mediante absorción de antígenos y/o anticuerpos en la superficie de los mismos y reacción inmunológica del anticuerpo o/y el antígeno con el antígeno y/o el anticuerpo de la muestra de prueba. Es sabido que los inmunoensayos que emplean estos portadores sólidos finos son incluso comúnmente también utilizados en campos distintos de los diagnósticos clínicos.

La medición de quimioluminiscencia utilizando reacciones quimioluminiscentes, en las que la quimioluminiscencia es causada al permitir que una enzima como la fosfatasa alcalina actúe sobre un sustrato quimioluminiscente como el 1,2-dioxetano, puede medir rápida y sensiblemente la presencia o concentración de un objeto a medir en una muestra, y ha sido ampliamente utilizada para medir virus como VIH y VHC, y trazas de otros componentes in vivo (JP 96-507694).

Es bien sabido que una reacción de desactivación ocurre en medio líquido, particularmente en medio acuoso con quimioluminiscencia por descomposición del sustrato quimioluminiscente que contiene dioxetano. Muchas muestras de ensayo son muestras biológicas en general, y así la medición de las muestras de ensayo con este método se realiza generalmente en medio acuoso. Por lo tanto, la reacción de desactivación a veces reduce sustancialmente la quimioluminiscencia ocurrida por la descomposición del sustrato quimioluminiscente que contiene dioxetano, que es realmente observado. En los métodos de medición de ciertas muestras de ensayo, p. ej. ácidos nucleicos, un anticuerpo viral y otras proteínas, en las que la detección a un bajo nivel es necesaria, la reducción de la quimioluminiscencia por la reacción de desactivación en combinación con las señales de fondo inevitables reduce la sensibilidad del método de medición, y así en algunos casos, la presencia a nivel extremadamente bajo, no puede ser detectada. Con el fin de mejorar estas reacciones de desactivación, una adición de macromoléculas solubles en agua que incluye tanto moléculas de origen natural como sintéticas (véase documento de Patente de EE.UU. n.º. 5,145,722), una adición de varios potenciadores solubles en agua a muestras de ensayo (véase documento de Patente de EE. UU. n.º. 4,978,614), o sales de amonio cuaternarias polimerizadas solubles en agua tales como el cloruro de poli(vinilbenciltrimetilamonio) (TMQ), cloruro de poli(vinilbenciltributilamonio) (TBQ), cloruro de poli [vinilbencil(bencildimetilamonio)] (BDMQ) han sido utilizadas como sales de amonio cuaternarias polimerizadas solubles en agua (Véase documento de Patente de EE. UU. n.º. 5,112,960 y JP 8-507694T).

Mientras tanto, los potenciadores de quimioluminiscencia tales como TMQ, TBQ y BDMQ descritos anteriormente, son polímeros con elevado peso molecular. En el caso de ser utilizados para la detección de una señal en inmunoensayos en fase sólida que emplean antígenos y/o anticuerpos inmovilizados sobre un portador sólido fino dispersable en un medio líquido, cuando los portadores son antes añadidos físicamente, por ejemplo, con el fin de limpiar después una reacción inmune, estos polímeros evitan que los portadores sólidos finos de dispersión después de eso, inhiban la luminiscencia causada por la reacción enzimática del sustrato quimioluminiscente que presenta dioxetano dependiendo de la concentración de la sustancia objeto a ser detectada, y a veces han tenido el problema de no haberse podido obtener un valor de medición preciso.

La solicitud de patente US-A-5 094 939 describe ensayos de quimioluminiscencia utilizando derivados de dioxetano estabilizados.

45 La solicitud de patente GB-A-2 233 451 describe mejoras de quimioluminiscencia.

La solicitud de patente internacional WO 95/17672 A describe ensayos de transferencia de energía quimioluminiscente.

La solicitud de patente europea EP-A-0561033 describe sales de fosfonio poliméricas que proporcionan un aumento de la quimioluminiscencia de los 1,2-dioxetanos.

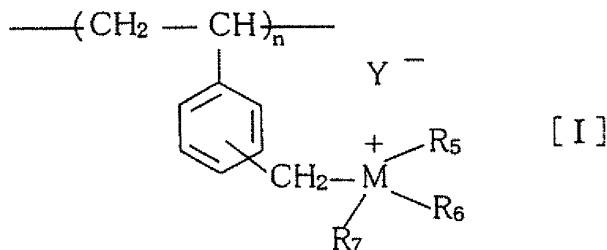
50 Descripción de la invención

El problema fundamental de la presente invención se resuelve por la materia objeto en la reivindicación independiente aneja. Las realizaciones preferidas se pueden extraer de las reivindicaciones dependientes anejas.

Más específicamente, el problema fundamental de la presente invención se resuelve por un inmunoensayo en fase sólida que utiliza un antígeno o/y anticuerpo inmovilizado sobre portadores sólidos finos dispersables en un medio

líquido, que comprende un método quimioluminiscente usado para la detección de señales que comprende hacer reaccionar un substrato quimioluminiscente que contiene dioxetano con fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, glucosidasa, glucuronidasa o esterasa como enzima de un cuerpo marcado en presencia de un potenciador de quimioluminiscencia, donde el potenciador de quimioluminiscencia es uno obtenido por tratamiento de un polímero soluble en agua representado por la siguiente fórmula general (I):

5



donde,

10

15

20

cada uno de R₅, R₆ y R₇ es un grupo alquilo no sustituido, lineal o ramificado, que tiene de 1 a 20 átomos de carbono; un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 carbonos sustituido con uno o mas grupos hidroxilo; un grupo alcoxi, un grupo ariloxi, un grupo amino, un grupo amino sustituido, un grupo amida o un grupo ureido; un grupo fluoroalcano; un grupo fluoroarilo; un grupo monocicloalquilo no sustituido que tiene de 3 a 12 átomos de carbono en el anillo; un grupo monoalquilo sustituido que tiene de 3 a 12 átomos de carbono en el anillo sustituido con uno o más de un grupo alquilo, un grupo alcoxi o un grupo benzo condensado; un grupo policicloalquilo que tiene dos o mas anillos condensados cada uno con 5 a 12 átomos de carbono, que está no sustituido o sustituido con uno o más de un grupo alquilo, un grupo alcoxi o un grupo arilo; un grupo arilo, un grupo alcarilo o un grupo aralquilo que tiene al menos un anillo y en total de 6 a 20 átomos de carbono, que está no sustituido o sustituido con uno o más de un grupo alquilo, un grupo arilo, fluor o un grupo hidroxilo, o al menos dos de R₅, R₆ y R₇ representan grupos capaces de formar junto con un átomo cuaternario al que están unidos un anillo saturado o insaturado, no sustituido o sustituido que tiene de 3 a 5 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos y contiene nitrógeno, fósforo o azufre, al que un anillo de benceno puede ser condensado.

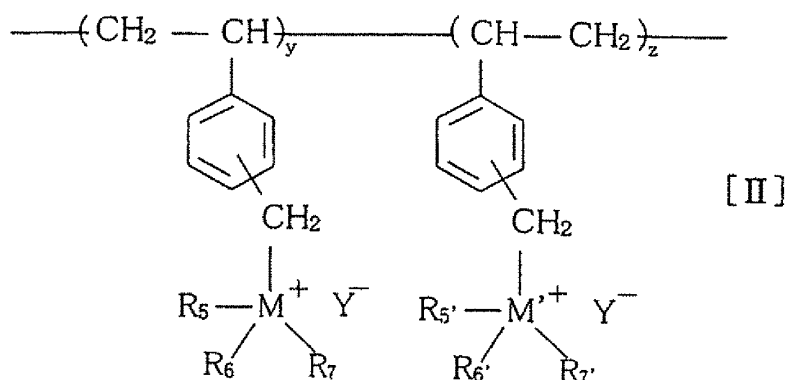
25

Y solo o en combinación representa un contraión seleccionado de un grupo que consiste en un ión halógeno, ión sulfato, ión alquil sulfonato, ión aril sulfonato, ión aril sulfonato sustituido, ión difenilntraceno sulfonato, ión perclorato, ión alcanato, ión aril carboxilato, ión benceno heteroaril carboxilato y dianiones orgánicos,

n representa un número en el intervalo de 500 a 500.000 (promedio de pesos moleculares), que es medido utilizando una viscosidad intrínseca o el método LALLS,

M es nitrógeno o fósforo,

o el copolímero soluble en agua de fórmula (II):



30

donde,

Y, M', R₅', R₆' y R₇' son los mismos Y, M, R₅, R₆ y R₇ definidos anteriormente, e y y z representan una fracción molar de un monómero individual que constituye el copolímero

35

con un agente oxidante o un agente reductor, inhibiendo de este modo el conglomerado de los portadores sólidos finos,

donde, el agente oxidante o el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en persulfato amónico, sulfito sódico, hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, metaperyodato sódico, permanganato potásico y dicromato potásico.

En una realización, los portadores sólidos finos son partículas.

5 En una realización, los portadores sólidos finos son partículas magnéticas.

En una realización, el potenciador de quimioluminiscencia no comprende un componente con un peso molecular superior a 400.000 daltons medido por un método de ultrafiltración.

En una realización, el sustrato quimioluminiscente que contiene dioxetano es un sustrato representado por la fórmula general:



15 donde R_2 es un grupo arilo sustituido con un grupo X-oxi, que forma el compuesto 1,2-dioxetano que es un intermedio oxido inestable, cuando X es eliminado por un activador seleccionado de ácido, base, enzima, catalizador orgánico o inorgánico y donador de electrones para inducir una reacción, en el que el compuesto 1,2-dioxetano inestable es descompuesto con liberación de la energía de los electrones para producir luz y dos compuestos que contiene carbonilos de fórmula general,



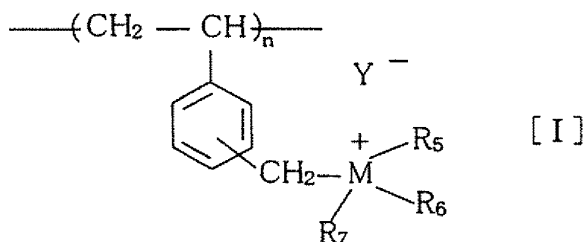
20 y X es un grupo que químicamente reacciona con facilidad que es eliminado por un enzima; R_1 es uno seleccionado del grupo que consiste en un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo ariloxi, un grupo dialquilamino, un grupo trialquilsililoxi, un grupo arilsililoxi, un grupo arilo y un grupo arilo que está ligado a un grupo arilo R_2 para formar un grupo arilo policíclico con sustitución de un grupo X-oxi, que está espiro-unido al anillo de 1,2-dioxetano; R_3 y R_4 son cada uno un grupo alquilo o un grupo heteroalquilo, o R_3 y R_4 puede estar unidos entre sí para formar un grupo alquileno policíclico que está espiro-unido al anillo de 1,2-dioxetano.

25 En una realización, los polímeros de fórmula (I) son seleccionados del grupo que consiste en cloruro de poli [vinilbencil(bencildimetilamonio)], cloruro de poli (vinilbenciltrimetilamonio), cloruro de poli [vinilbencil(tributilamonio)], cloruro de bencilmetilcetilamonio, cloruro de polimetacrilamidapropilenmetilamonio, cloruro de poli [vinilbencil(trietilamonio)], cloruro de poli [vinilbencil(2-bencilamino)etil dimetilamonio], cloruro de poli [vinilbencil] dimetil(2-hidroxi)etilamonio, cloruro de poli [vinilbencil](trimetilfosfonio), cloruro de poli [vinilbencil(tributilfosfonio)] y cloruro de poli [vinilbencil(trioctilfosfonio)] y copolímeros de los mismos.

30 Como resultado de un estudio intensivo, los inventores de la presente invención han encontrado que un potenciador de quimioluminiscencia tal como sales de amonio cuaternarias macromoleculares solubles en agua, sales de sulfonio cuaternarias o sales de fosfonio cuaternarias tratadas con un reactivo permitiendo unas propiedades de oxidación o reducción que mejora de forma mas estable la emisión de luz causada por una reacción enzimática de un sustrato quimioluminiscente que contiene dioxetano en la detección de señales en inmunoensayos en fase sólida y proporciona resultados de medida mas precisos, y han completado la invención.

35 La presente invención está relacionada con un inmunoensayo en fase sólida usando un antígeno o/y anticuerpo inmovilizado sobre portadores sólidos finos dispersables en un medio líquido, que comprende un método de quimioluminiscencia utilizado para la detección de la señal, que comprende hacer reaccionar un sustrato quimioluminiscente que tiene dioxetano con fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, glucosidasa, glucouronidasa o esterasa como enzima marcada en presencia de un potenciador de quimioluminiscencia, donde el potenciador de quimioluminiscencia es obtenido por tratamiento de un polímero soluble en agua representado por la siguiente fórmula general (I):

40



donde,

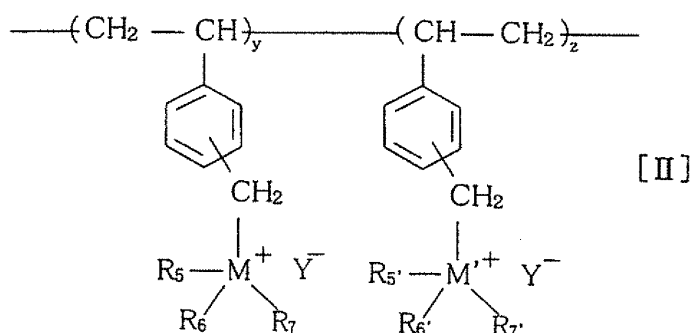
5 cada R₅, R₆ y R₇ es un grupo alquilo no sustituido lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono; un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono sustituido con uno o mas grupos hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo ariloxi, un grupo amino, un grupo amino sustituido, un grupo amida o un grupo ureido; un grupo fluoroalcano; un grupo fluoroarilo; un grupo monocicloalquil no sustituido que tiene de 3 y 12 átomos de carbono en el anillo; un grupo monocicloalquilo sustituido que tiene de 3 y 12 átomos de carbono en el anillo sustituido con uno o más de un grupo alquilo, un grupo alcoxi o un grupo benzo condensado; un grupo policicloalquilo que tiene dos o mas anillos condensados teniendo cada uno de 5 a 12 átomos de carbono, que está no sustituido o sustituido con uno o más de un grupo alquilo, un grupo alcoxi o un grupo arilo; un grupo arilo, un grupo alcarilo o un grupo aralquilo que tiene al menos un anillo y en total de 6 a 20 átomos de carbono, que está no sustituido o sustituido con uno o más de un grupo alquilo, un grupo arilo, fluor o grupo hidroxilo, o al menos dos de R₅, R₆ y R₇ representan grupos capaces de formar junto con un átomo cuaternario al que están unidos un anillo saturado o insaturado, no sustituido o sustituido que tiene de 3 a 5 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos y que contiene nitrógeno, fósforo o azufe, al que un anillo de benceno puede ser condensado.

Y solo o en combinación representa un contraión seleccionado del grupo que consiste un ión halógeno, ión sulfato, ión alquil sulfonato, ión aril sulfonato, ión aril sulfonato sustituido, ión difenilantraceno sulfonato, ión perchlorato, ión alcanato, ión aril carboxilato, ión benceno heteroaril carboxilato y dianiones orgánicos,

20 n representa un número dentro de un intervalo de 500 a 500.000 (promedio de pesos moleculares), que son medido usando un método de viscosidad intrínseca o un método de LALLS,

M es nitrógeno o fósforo,

o el copolímero soluble en agua de fórmula (II):



25 donde Y, M', R₅', R₆' y R₇' son los mismos definidos anteriormente Y, R₅, R₆ y R₇ y y y z representan una fracción molar de un monómero individual que constituye un copolímero con un agente oxidante o un agente reductor inhibiendo de este modo el conglomerado de los portadores sólidos finos,

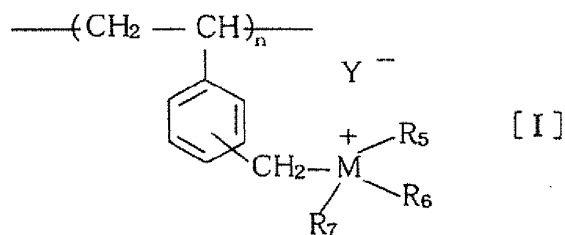
donde el agente oxidante o el agente reductor es seleccionado de un grupo que consiste en persulfato amónico, sulfito sódico, hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, metaperiodato sódico, permanganato potásico y dicromato potásico.

30 También se describe el potenciador de quimioluminiscencia utilizado para detección de señales en inmunoensayos en fase sólida que utilizan antígenos o/y anticuerpos inmovilizados sobre portadores sólidos finos dispersables en un medio líquido, que consiste en una sal de amonio cuaternaria macromolecular soluble en agua, una sal de sulfonio cuaternaria o una sal de fosfonio cuaternaria con el fin de mejorar la emisión de luz causada por la reacción enzimática de un sustrato quimioluminiscente que contiene dioxetano, donde al potenciador quimioluminiscente se le da un tratamiento para la inhibición de la conglomeración de los portadores sólidos finos por tratamiento con un agente oxidante o un agente reductor, y un método de quimioluminiscencia y un equipo de reactivos que utilizan el potenciador de quimioluminiscencia.

40 En una realización el potenciador es un potenciador de quimioluminiscencia que no contiene significativamente un componente de peso molecular mayor que aproximadamente 400.000 Daltons en peso molecular separado por un método de ultrafiltración.

El mejor modo de realizar la invención 2

45 Como se describe anteriormente el potenciador de quimioluminiscencia del inmunoensayo reivindicado es una sal de amonio cuaternaria, sal de sulfonio cuaternaria o sal de fosfonio cuaternaria macromolecular soluble en agua, o similar, que son tratadas con un reactivo que presenta propiedades de oxidación o reducción, y está representado por la siguiente formula general (I):



En la fórmula general (I), cada uno de R_5 , R_6 y R_7 puede ser un grupo alquilo no sustituido lineal o ramificado, que presenta de 1 a 20 átomos de carbono (p. ej. grupo metilo, grupo etilo, grupo n-butilo, grupo t-butilo o grupo hexilo o similares); un grupo alquilo lineal o ramificado que contiene de 1 a 20 átomos de carbono sustituido con uno o más de un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, (p. ej. metoxi, etoxi, benciloxi o un grupo polioxietiletoxi), un grupo ariloxi (p. ej. un grupo fenoxi), un grupo amino, un grupo amino sustituido (p. ej. metilamino), un grupo amido (p. ej. un grupo acetamido) o un grupo ureido (p. ej. un grupo fenilureido); un grupo fluoroalcano; un grupo fluoroarilo (p. ej. un grupo heptafluoro butilo); un grupo monocicloalquilo no sustituido que tiene un anillo de 3 a 12 átomos de carbono (p. ej. un grupo ciclohexilo o ciclooctilo); un grupo monocicloalquilo sustituido que tiene un anillo de 3 a 12 átomos de carbono sustituido con uno o más de un grupo alquilo, un grupo alcoxi o un grupo benzo condensado (p. ej. un grupo metoxiciclohexilo o un grupo 1,2,3,4-tetrahidronaftilo); un grupo policicloalquilo que presenta dos o más anillos condensados cada uno de ellos de 5 a 12 átomos de carbono, que están no sustituidos o sustituidos con uno o más de un grupo alquilo, un grupo alcoxi, o un grupo arilo (p. ej. un grupo 1-adamantilo o un grupo 3-fenil-1-adamantilo); un grupo arilo, un grupo alcarilo o un grupo aralquilo que tiene al menos un anillo y en total entre 6 y 20 átomos de carbono, que están no sustituidos o sustituidos con uno o más de un grupo alquilo, un grupo arilo, fluor o un grupo hidroxilo (p. ej. un grupo fenilo, un grupo naftilo, un grupo pentafluorfenilo, un grupo etilfenilo, un grupo bencilo, un grupo hidroxibencilo, un grupo fenilbencilo o un grupo deshidroabietilo); al menos dos de R_5 , R_6 y R_7 representan grupos capaces de formar junto con el átomo cuaternario al que están unidos, un anillo saturado o insaturado, no sustituido o sustituido que tiene de 3 a 5 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos y que contiene nitrógeno, fósforo o azufre, al que un anillo de benceno puede ser condensado (p. ej. 1-piridinio, 1-(3-alquil)imidazolio, 1-(3-aralquil)imidazolio, morfolina, alquil morfolinio, alquil piperidinio, N-acil piperidinio, piperidina, acil piperidinio, benzoxazolio, benzotiazolio o benzamidazolio).

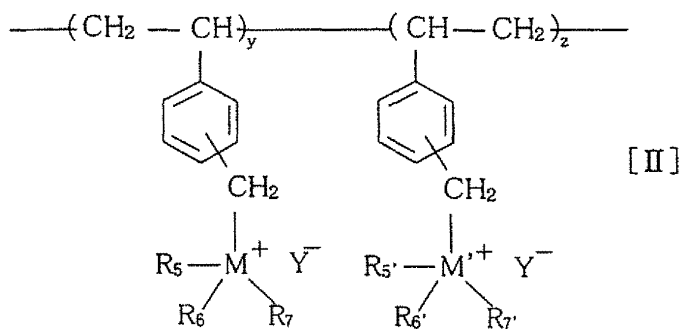
Un símbolo Y en la fórmula general (I) solo o en combinación representa un contraión capaz de incluir restos tales como ión halógeno, es decir, ión fluor, ión cloro, ión bromo y ión yodo, ión sulfato, ión alquil sulfonato (p. ej. ión metil sulfonato), ión aril sulfonato (p. ej. ión p-toluen sulfonato), ión aril sulfonato sustituido (p. ej. ión anilinoaftaleno sulfonato y varios isómeros de éstos), ión difenilantraceno sulfonato, ión perclorato, ión alcanato (p. ej. ión acetato), ión aril carboxilato (p. ej. fluoresceína o derivados de fluoresceína), ión aril heterociclo carboxilato (p. ej. ión 7-dietilamino-4-cianocumarin-3-carboxilato). Dianiones orgánicos tales como el ión p-tereftalato pueden ser representados por Y.

Asimismo, un símbolo n representa un número dentro del intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 500.000 (promedio de pesos moleculares), preferentemente de 20.000 a 70.000 cuando el peso molecular de tales sales cuaternarias de poli(vinilbencilo) es medido utilizando un método de viscosidad intrínseca o un método LALLS. Los métodos de preparación de estos polímeros donde M es nitrógeno, copolímeros relacionados y materiales de partida relacionados están descritos en Jones, G. D., Journal of Polymer Science, Vol 25:201, 1958; patentes de EE. UU. núms. No. 2,780,064, No. 3,178,396, No. 3,770,439, No. 4,308,335, No. 4,340,522, No. 4,424,326 y Patente alemana publicada No. 2,447,611. Un símbolo M puede ser fósforo o azufre, y aquí, los correspondientes polímeros de fosfonio o sulfonio están descritos en patentes anteriores (patentes de EE. UU. núms. No. 3,236,820 y No. 3,065,272).

Como potenciador de quimioluminiscencia que tiene una estructura indicada por la fórmula general (I), los seleccionados de cloruro de poli[vinilbencil(bencildimetilamonio)] (BMDQ), cloruro de poli(vinilbenciltrimetil amonio) (TMQ), cloruro de poli[vinilbencil(tributil amonio)] (TBQ), cloruro de bencilmetilcetil amonio (BDMCAC), cloruro de polimetacrilamidopropilmetil amonio (poli MAPTAC), cloruro de poli[(vinilbencil(trietil amonio)] (TEQ), cloruro de poli[vinilbencil(2-bencilamino)etil dimetil amonio] (BAEDM), cloruro de poli[vinilbencil dimetil(2-hidrox)etil amonio] (DME(OH)B), cloruro de poli[vinilbencil(trimetil fosfonio)] (TM), cloruro de poli[vinilbencil(tributil fosfonio)] (TB) y cloruro de poli[vinilbencil(trioctil fosfonio)] (TO) y copolímeros de estos, son adecuados.

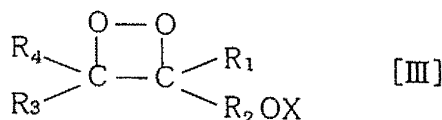
Los potenciadores de quimioluminiscencia de fórmula general (I) que son particularmente preferibles en la invención son aquellos seleccionados de cloruro de poli[vinilbencil(bencildimetil amonio)] (BMDQ), cloruro de poli(vinilbenciltrimetilamonio) (TMQ), cloruro de poli[vinilbencil(tributil amonio)] (TBQ), cloruro de poli[vinilbencil(trietil amonio)] (TEQ), cloruro de poli[vinilbencil(trimetil fosfonio)] (TM), cloruro de poli[vinilbencil(tributil fosfonio)] (TB) y cloruro de poli[vinilbencil(trioctil fosfonio)] (TO) y copolímeros de éstos, mas preferiblemente aquellos seleccionados entre cloruro de poli(vinilbenciltrimetilamonio) (TMQ), cloruro de poli[vinilbencil(tributil amonio)] (TBQ) y cloruro de poli[vinilbencil(bencildimetil amonio)] (BMDQ), cloruro de poli[vinilbencil(trietil amonio)] (TEQ) y copolímeros de éstos, y mas preferiblemente cloruro de poli[vinilbencil(tributil amonio)] (TBQ) y el cloruro de poli[vinilbencil(bencildimetil amonio)] (BMDQ).

Como se describe en la siguiente fórmula general (II), un copolímero que tiene dos o más diferentes cadenas laterales onio puede ser también utilizado en la invención expuesta aquí. Los símbolos Y , M' , R_5' , R_6' y R_7' son los mismos Y , M , R_5 , R_6 y R_7 definidos anteriormente. Los símbolos y y z representan una fracción molar de un monómero individual que constituye el copolímero. Por lo tanto, la suma de los símbolos y y z siempre es igual a 1, y cada uno de ellos puede variar de 0,01 a 0,99. Como resto adecuado, M es nitrógeno o fósforo, y R_5 a R_7 son cada uno independientemente un alquilo, cicloalquilo, policicloalquilo (p. ej. grupo adamantano), grupo aralquilo o arilo de 1 a 20 átomos de carbono no sustituido o sustituido además con un grupo hidroxilo, amino, amido o grupo ureido, o juntos forman un grupo onio heterociclo (en algunos casos, aromático o alifático o mezcla incluyendo otros heteroátomos tales como nitrógeno, azufre u oxígeno) vía un espiro enlace con un átomo M .



La reacción de quimioluminiscencia en sí en la que se usa el potenciador de quimioluminiscencia del inmunoensayo reivindicado es conocida. Las enzimas para llevar a cabo la reacción de quimioluminiscencia pueden ser fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, galactosidasa, glucosidasa, glucouronidasa o esterasa, y ejemplos preferibles pueden incluir fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, glucosidasa, galactosidasa y esterasa. La más preferible es la fosfatasa alcalina. Estas enzimas pueden ser purificadas a partir de animales, plantas, bacterias y similares por métodos conocidos públicamente, y están también disponibles en casas comerciales. Preferentemente también se pueden utilizar artículos disponibles en casas comerciales. Estas enzimas pueden estar en estado libre o unidas a otras sustancias tales como un antígeno, un anticuerpo y un hapteno.

El sustrato de la reacción de quimioluminiscencia utilizado aquí puede incluir un derivado de dioxetano representado por la siguiente fórmula general (III):



donde R_2 es un grupo arilo sustituido con un grupo X-oxi, que forma un compuesto 1,2-dioxetano que es un óxido intermedio inestable donde X es eliminado por un activador seleccionado de un ácido, base, sal, enzima, catalizador orgánico o inorgánico y un electrodonador para inducir una reacción, y el compuesto inestable 1,2-dioxetano es descompuesto con la liberación de la energía de electrones para producir luz y compuestos que contienen dos carbonilos, además, X es un grupo químico fácilmente reactivo que es eliminado por una enzima; R_1 es seleccionado de un grupo que consiste en un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo ariloxi, un grupo dialquilamino, un grupo trialquilsililoxi, un grupo arilsililoxi, un grupo arilo, y un grupo arilo que forma un grupo arilo policíclico de sustituyente X-oxi espiro unido al anillo de 1,2-dioxetano mediante la unión a un grupo arilo R_2 ; R_3 y R_4 son cada uno de ellos un grupo alquilo o heteroalquilo y R_3 y R_4 pueden estar unidos entre sí para formar un grupo alquileo policíclico espiro unido al anillo de 1,2-dioxetano.

En la fórmula general (III), cuando R_1 no está unido a R_2 , este R_1 es un grupo alquilo, alcoxi, ariloxi, dialquilamino, trialquilsililoxi, arilsililoxi o arilo como se describe anteriormente, y preferiblemente un grupo alquilo o alcoxi inferior que tiene de 1 a 8 átomos de carbono. R_1 puede ser también un grupo arilo, ariloxi o arilsililoxi que tiene de 6 a 20 átomos de carbono. Cuando R_1 está unido a R_2 que es un grupo arilo para formar un grupo arilo policíclico espiro unido al anillo de 1,2-dioxetano, es preferible que el grupo arilo policíclico tenga más de 30 átomos de carbono. El grupo arilo policíclico en este caso puede ser uno en el que un átomo de oxígeno este incluido en lugar de un átomo de carbono como en el grupo xantenilo, y fluorenilo o xantenilo donde es preferible el grupo arilo policíclico espiro unido está espiro unido al anillo de 1,2-dioxetano en la posición C9 del grupo.

R_2 es un grupo arilo sustituido con un grupo X-oxi (grupo OX), y el grupo que incluye el grupo arilo puede ser un grupo fenilo, bifenilo, fenilo unido u otro grupo arilo, que incluye de 6 a 30 átomos de carbono, e incluye otro sustituyente. X es un grupo eliminado del dioxetano por el activador para descomponer una estructura de dioxetano estable y producir quimioluminiscencia (señal). Es preferible que el grupo OX sea seleccionado entre un grupo hidroxilo, alquilsililoxi, arilsililoxi, una sal inorgánica oxi ácida (particularmente, sal fosfato o sal sulfato), oxígeno piranósido, un grupo arilcarboxilester o alquilcarboxilester. Cuando el grupo OX es un grupo hidroxilo, un átomo de hidrógeno del grupo es fácilmente reactivo con una base orgánica tal como t-butoxido potásico o una base

inorgánica tal como el hidróxido potásico, y puede ser descompuesto por la base para producir la quimioluminiscencia. Cuando el activador es una enzima utilizada con frecuencia como una etiqueta para inmunoensayos o detección de sondas de ADN, podría seleccionarse adecuadamente el grupo OX que tiene un X que reacciona fácilmente con la enzima. Por ejemplo, cuando el activador es una fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, aril o acetilcolina esterasa, o similares comúnmente empleados como detectores de un sustrato colorimétrico o un sustrato fluorescente en el inmunoensayo o la detección de la sonda de ADN, una sal de fosfato, oxígeno piranósido o un grupo ester acetato pueden ser seleccionados como grupo OX.

R₃ o R₄ es cada uno un grupo alquilo o un grupo heteroalquilo, y pueden estar unidos uno al otro para formar una estructura de anillo y formar un grupo alquileno policíclico. El grupo alquileno policíclico puede incluir de 6 a 30 átomos de carbono, e incluir heteroátomos (nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo). El grupo alquileno policíclico preferible es un grupo adamantilo. R₃ y R₄ confieren estabilidad a la estructura de dioxetano, y pueden tener un sustituyente siempre y cuando el sustituyente no debilite la estabilidad.

En los compuestos que tienen la estructura de dioxetano indicada anteriormente, los sustratos quimioluminiscentes adecuados son el ácido 3-(4-metoxispiro[1,2-dioxetano-3,2'-tricyclo[3.3.1^{3,7}]decano]-4-il)fenilfosfórico y particularmente la sal disódica de éste (AMPPD), y el ácido 3-(4-metoxispiro[1,2-dioxetano-3,2'-(5-cloro)tricyclo[3.3.1^{3,7}]decano]-4-il)fenilfosfórico y particularmente la sal disódica de éste (CSPD) (Véase documento de Patente de EE. UU. No. 4,962, 162 y la patente japonesa No. 2552413).

Los portadores sólidos finos utilizados en la invención incluyen eritrocitos animales, partículas de gelatina, partículas de latex, partículas magnéticas, y similares. La partícula de gelatina recogida aquí se refiere a una partícula compuesta por polisacáridos solubles en agua, metafosfato sódico y un aldehído como agente de entrecruzamiento en adición a la gelatina (véase documento de Patente JP 93-306113 A y documento de Patente JP 88-48021 B), la partícula de latex indica una partícula compuesta de una resina sintética como un poliestireno y una resina acrílica que es una macromolécula orgánica, y está también disponible en casas comerciales. Preferiblemente es también posible utilizar artículos comercialmente disponibles.

Los portadores sólidos finos utilizados en la invención comprenden portadores procesados para tener magnetismo como partículas magnéticas cuyo núcleo es una macromolécula orgánica y la superficie tiene una capa de recubrimiento de óxido férrico tipo ferrita. Las partículas magnéticas pueden eficazmente realizar una separación B/F utilizando una fuerza magnética (véase documento de Patente Japonesa No. 3192149 y No. 2979414). En particular, preferiblemente las partículas magnéticas utilizadas incluyen, por ejemplo, partículas donde el núcleo es magnetita y está recubierto de silano (véase documento de Patente JP 80-141670 A y documento de Patente JP 75-122997 A), partículas donde el núcleo es un óxido metálico magnético y está recubierto de silano (véase documento de Patente JP 85-1564 A), partículas magnéticas donde el núcleo es un compuesto macromolecular orgánico, que tiene una capa de recubrimiento de óxido férrico tipo ferrita (véase documento de Patente japonesa No. 2979414), y además partículas que contienen gelatina en una superficie de partículas magnéticas donde el núcleo es un compuesto macromolecular orgánico (véase documento de Patente japonesa No. 3192149).

Los portadores sólidos finos no están particularmente limitados a éstos, y portadores apropiados son seleccionados dependiendo del objeto de cada medición y la constitución del equipo de reactivos utilizado. Mientras el portador se utilice en el inmunoensayo en fase sólida, los efectos de la invención son ejercidos por el potenciador de quimioluminiscencia.

El potenciador de quimioluminiscencia del inmunoensayo reivindicado puede ser preparado por un tratamiento que utiliza un reactivo que presenta propiedades de oxidación o reducción. Un agente de oxidación o un agente de reducción utilizado aquí incluye persulfato amónico, periodato sódico, sulfito sódico, hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, metaperyodato sódico, permanganato potásico, dicromato potásico y similares. El agente oxidante o agente reductor particularmente preferible incluye persulfato amónico, sulfito sódico, hipoclorito sódico, y metaperyodato sódico, y más preferiblemente puede incluir sulfito sódico e hipoclorito sódico.

Cuando se prepara el potenciador de quimioluminiscencia del inmunoensayo reivindicado, un potenciador de quimioluminiscencia de la fórmula general (I) y (II) anteriormente indicada, preparado por métodos conocidos, o el potenciador de quimioluminiscencia de un artículo disponible en casas comerciales es tratado con el agente oxidante o reductor anteriormente indicado bajo condiciones apropiadas. Como condiciones de tratamiento, teniendo en cuenta la especie química, peso molecular, concentración y similares del potenciador de luminiscencia, es posible seleccionar apropiadamente la concentración del reactivo, el tiempo de reacción, la temperatura de reacción, el sistema de disolvente utilizado y similares del agente oxidante o del agente reductor. Las condiciones no están particularmente limitadas, y por ejemplo, cuando el potenciador de quimioluminiscencia está en una cantidad de aproximadamente desde varios gramos hasta cientos de gramos, el potenciador de quimioluminiscencia de acuerdo con la invención puede ser obtenido por tratamiento con sulfito sódico 5mM a temperatura ambiente durante una hora, o hipoclorito sódico al 0,1% a temperatura ambiente durante dos horas, o persulfato amónico 1mM y metaperyodato sódico 1mM a 60 °C durante dos horas, o peróxido de hidrógeno al 15% a temperatura ambiente durante 17 horas, o permanganato potásico 1 mM y dicromato potásico 1mM a 80 °C durante dos horas. Es sabido que el sulfito sódico presenta propiedades de oxidación o propiedades de reducción dependiendo de las condiciones.

- 5 Como se indica en los siguientes ejemplos, es deseable que el potenciador de quimioluminiscencia del inmunoensayo reivindicado sea purificado utilizando una membrana de diálisis que corta a pesos moleculares por debajo de 14.000 después del tratamiento con hipoclorito sódico. Se ha mostrado que muchos de los potenciadores de quimioluminiscencia no tratados no pueden pasar a través del filtro en una ultrafiltración con corte en 300.000 de peso molecular mientras que el potenciador de luminiscencia del inmunoensayo reivindicado puede pasar a través de él. Además, se ha encontrado que incluso en los potenciadores de quimioluminiscencia cuya permeabilidad a través del filtro sea baja dependiendo de las condiciones de oxidación/reducción, la permeabilidad del potenciador de quimioluminiscencia del inmunoensayo reivindicado se puede mejorar cambiando las condiciones de la solución de diálisis.
- 10 Como se indica en los siguientes ejemplos, se ha demostrado que cuando el potenciador de quimioluminiscencia del inmunoensayo reivindicado es añadido a los portadores sólidos finos, i. e., por ejemplo, un sistema de dispersión de partículas magnéticas, la dispersabilidad es mejorada, en comparación con la adición de un potenciador de quimioluminiscencia no tratado. Se cree que la capacidad de dispersión favorable de tales portadores sólidos finos conlleva mejoras y la estabilización de la luminiscencia (señal) por reacción enzimática del sustrato quimioluminiscente que tiene dioxetano.
- 15

Ejemplos 2

[0040] En lo sucesivo, la invención como se define en las reivindicaciones es explicada concretamente en los ejemplos. Sin embargo, la invención como se define en las reivindicaciones no está limitada a los siguientes ejemplos.

- 20 Ejemplo 1-1: Efecto de TBQ no tratado y TBQ oxidado/reducido sobre la medición de la quimioluminiscencia

[0041] A 2 ml de solución de TBQ (35,2 mg/ml), 2 ml de solución de sulfito sódico 2mM, 0,015% (concentración efectiva de cloro) de solución de hipoclorito sódico, se añadió metaperyodato sódico 2mM o persulfato amónico 2mM, mezcló y posteriormente se trató a 60 °C durante 4 horas. Este TBQ tratado fue distribuido en una membrana de diálisis (corte de peso molecular entre 12.000 y 14.000, suministrada por Sanko Junyaku Co., Ltd.), y luego dializado usando agua MilliQ (agua ultrapura) como una solución externa para producir TBQ tratado. Después, 0,4 mg/ml de una solución de AMPPD (dianolamina 0,2M (DEA), cloruro magnésico 1 mM (MgCl₂), azida sódica al 0,05% (NaN₃), pH 10,0) conteniendo 0,8 mg/ml de TBQ no tratado o TBQ tratado en preparación (solución sustrato). Partículas magnéticas (200 µl) unidas a fosfatasa alcalina al 0,015% (ALP) fueron suministradas a un reactor, y las partículas fueron atraídas por un imán poniendo el imán cerca de las partículas para eliminar el sobrenadante y los lavados. A este reactor, 200 µl de la solución sustrato indicada anteriormente fueron añadidos y mezclados, se hicieron reaccionar a 37 °C durante 5 min, posteriormente la emisión de luz (señal) fue contada por un contador de fotones (suministrado por Hamamatsu Photonics K. K.), y se calculó un valor integrado para 2 segundos. La reacción de las partículas magnéticas indicadas anteriormente con el sustrato fue realizada cinco veces. Este resultado se muestra en la tabla 1. Comparando el TBQ no tratado, con el grupo de TBQ tratado, en todas las condiciones, la señal fue incrementada y la repetibilidad (valor de CV) fue también mejorada.

25

30

35

Tabla 1

TBQ no tratado	TBQ tratado				
	Sulfito sódico	hipoclorito sódico	metaperyodato sódico	persulfato amonico	
Recuento	1.188.601	1.795.546	1.900.953	1.882.699	1.887.294
	1.144.091	1.803.082	1.893.218	1.880.734	1.853.619
	1.159.564	1.760.605	1.859.213	1.864.943	1.855.904
	1.100.897	1.774.889	1.881.518	1.859.709	1.852.409
	1.164.963	1.768.074	1.864.585	1.845.497	1.837.743
Promedio	1.151.623	1.780.439	1.879.897	1.866.716	1.857.394
CV	28%	1,0%	1,0%	0,8%	1,0%

- Ejemplo 1-2: Efecto del TBQ no tratado y TBQ oxidado/reducido sobre la dispersión de partículas

40 Una solución de DEA (0,1M, pH 10,0) que tiene 0,8 mg/ml de TBQ no tratado o TBQ tratado se preparó. Después, 100 µl de partículas magnéticas al 0,03% fueron suministradas al reactor, y las partículas fueron atraídas por un imán poniendo el imán cerca de las partículas y el sobrenadante fue eliminado. Se añadió la solución de DEA (200 µl) que incluye el TBQ anterior y se agitó durante 30 segundos. Quince segundos después de agitar, 150 µl se

cogieron de la superficie de la solución con una pipetman (suministrada por Gilson, una micropipeta), se distribuyó en la célula para el espectrofotómetro, y después de 10 segundos, una turbidez (OD500) se midió con el espectrofotómetro (UV-1.200), suministrado por Shimadzu Corporation). Este resultado se muestra en la tabla 2. Comparando TBQ no tratado con el grupo TBQ tratado, la turbidez es más alta y la dispersión de las partículas fue mejorada.

5

Tabla 2

TBQ no tratado	TBQ tratado				
	Sulfito sódico	hipoclorito sódico	metaperyodato sódico	persulfato amonico	
Turbidez	0,035	0,261	0,368	0,430	0,487

Ejemplo 2-1: Efecto del TBQ no tratado y TBQ oxidado/reducido sobre la medición de la quimioluminiscencia

10 A 2 mL de una solución de TBQ 35,2 mg/ml, se añadieron 2 ml de una solución que tiene 0,005%, 0,05% o 0,5% de hipoclorito sódico como concentración efectiva de cloro fue añadido, se mezcló y posteriormente se dejó a 25 °C durante 24 horas. Después, la mezcla es distribuida en la membrana de diálisis (corte de peso molecular de 12.000 a 14.000, suministrada por Sanko Junyaku Co., Ltd.), y a continuación se realizó la diálisis usando agua MilliQ como una solución externa para preparar el TBQ tratado. Después, se preparó 0,2 mg/ml de una solución de AMPPD (DEA 0,1M, MgCl₂ 1mM, NaN₃ al 0,05%, pH 10,0) que contiene 0,8 mg/mL de TBQ no tratado o TBQ tratado (solución sustrato). Luego 200 µl de ALP-unido a partículas magnéticas al 0,015% fueron suministrados al reactor, y las partículas fueron atraídas por un imán poniendo el imán cerca de las partículas, para eliminar el sobrenadante y los lavados. Después, se añadió y mezcló 200 µl de la solución sustrato anterior y se hizo reaccionar a 37 °C durante 5 min, posteriormente la emisión de luz (señal) fue contada por un contador de fotones (suministrado por Hamamatsu Photonics K. K.), y se calculó un valor integrado para dos segundos. Este resultado se muestra en la tabla 3. Comparando el TBQ no tratado, con el grupo de TBQ tratado, en todas las condiciones, la señal fue incrementada y la repetibilidad (valor de CV) fue también mejorada.

15

20

Tabla 3

TBQ no tratado	TBQ tratado con hipoclorito sódico			
	tratado con 0,005%	tratado con 0,05%	tratado con 0,5%	
Recuento	1.243.067	1.939.907	1.874.673	1.742.837
	1.138.533	1.951.098	1.904.467	1.747.014
	1.185.676	1.958.058	1.896.528	1.742.927
	1.213.137	1.958.925	1.928.099	1.749.573
	1.046.363	1.944.462	1.889.804	1.753.686
	1.198.577	1.931.453	1.879.883	1.738.024
Promedio	1.170.892	1.947.317	1.895.576	1.745.677
CV	6,0%	0,6%	1,0%	0,3%

Ejemplo 2-2 Efecto del TBQ no tratado y TBQ oxidado/reducido sobre la dispersión de las partículas

25 Un TBQ tratado fue obtenido por el método descrito en el ejemplo 2-1. Se preparó una solución de DEA (0,1M, pH 10,0) que contiene 0,8 mg/ml de TBQ no tratado o TBQ tratado fue preparada. Luego, 100 µl de partículas magnéticas al 0,03% se suministraron al reactor, y las partículas fueron atraídas por un imán poniendo el imán cerca de las partículas y el sobrenadante fue eliminado. Se añadió la solución de DEA (200 µl) que incluye el TBQ y se agitó durante 30 segundos. Quince segundos después de agitar, se cogieron 150 µl de la superficie de la solución con una pipetman (suministrada por Gilson, una micropipeta), se distribuyó en la célula para el espectrofotómetro, y después de 10 segundos, una turbidez (OD500) se midió con el espectrofotómetro (UV-1.200), suministrado por Shimadzu Corporation). Este resultado se muestra en la tabla 4. Comparando TBQ no tratado con el grupo TBQ tratado, la turbidez es más alta y la dispersión de las partículas fue mejorada.

30

Tabla 4

	TBQ no tratado	TBQ Tratado hipoclorito sódico		
		tratado con 0,005%	tratado con 0,05%	tratado con 0,5%
Turbidez	0,035	0,314	0,385	0,510

Ejemplo 3: Permeabilidad a través de filtro de ultrafiltración del TBQ no tratado y TBQ oxidado/reducido

5 El TBQ no tratado y el TBQ tratado fueron diluidos a 1 mg/ml o menos con cloruro sódico (NaCl) 0,1M o 1M. Esta solución fue ultrafiltrada a través de un filtro de ultrafiltración con un corte de peso molecular de 300.000 (suministrado por Millipore), la absorbancia (OD268) del filtrado fue medida, y la permeabilidad fue calculada. El resultado se muestra en la tabla 5. Comparado con el TBQ no tratado, la permeabilidad en el filtro del TBQ tratado fue incrementada. Para el TBQ tratado con hipoclorito sódico al 0,005% cuya permeabilidad fue baja en una solución de NaCl 0,1M, cuando se disolvió en una solución de NaCl 1M, su permeabilidad del filtro fue mejorada.

10 **Tabla 5**

	TBQ no tratado	TBQ tratado con hipoclorito sódico		
		tratado con 0,005%	tratado con 0,05%	tratado con 0,5%
Permeabilidad en el filtro	solución NaCl 0,1M	3%	94%	95%
	solución NaCl 1M	7%	96%	

Ejemplo 4: Efecto del TBQ no tratado y del TBQ oxidado/reducido en el inmunoensayo de quimioluminiscencia (1)

15 A 2 ml de TBQ 35,2 mg/ml, se añadieron 2 ml de una solución de sulfito sódico 2M, mezcló y después se trató a 60 °C durante 4 horas. Después, ésta fue distribuida en una membrana de diálisis (corte de pesos moleculares entre 12.000 y 14.000, suministrada por Sanko Junyaku Co., Ltd.), y la diálisis fue realizada utilizando agua MilliQ como una solución externa para hacer el TBQ tratado. Después, se preparó una solución de AMPPD 0,02 mg/ml (DEA 0,1M, MgCl₂ 1mM, NaN₃ al 0,05%, pH 10,0) que contiene 0,8 mg/ml de TBQ no tratado o TBQ tratado (solución sustrato). Muestras de ensayo conteniendo 0, 10, 100, 800 y 2000 ng/ml de α -fetoproteína (AFP) fueron diluidas hasta 20 veces con una solución de BSA. Cada muestra medida (20 μ l) fue añadida al reactor en el que se pusieron 20 μ l de anti-AFP al 0,03% anticuerpo-unida a partículas magnéticas se mezclaron y se dejaron reaccionar a 37 °C durante 8 min.

25 Después, las partículas fueron atraídas por un imán poniendo el imán cerca del reactor para eliminar el sobrenadante y los lavados. Luego, se añadieron 50 μ l de una solución 0,1 μ g/ml de ALP conjugado con anticuerpo anti-AFP, se mezcló y se dejó reaccionar a 37 °C durante 8 min. Después de la reacción, las partículas fueron atraídas por un imán poniendo el imán cerca del reactor, el sobrenadante fue eliminado y lavado. La solución de sustrato anterior (200 μ l) se añadió a estas partículas, se mezcló y se dejó reaccionar a 37 °C durante 4 min. Después, la emisión de la luz (señal) fue contada por un contador de fotones (suministrado por Hamamatsu Photonics K. K.), y se calculó un valor integrado para dos segundos. El resultado se muestra en la tabla 6. Comparando los casos de TBQ no tratado, la repetibilidad (valor CV) usando TBQ tratado con sulfito sódico fue mejorada.

[Tabla 6]

Tabla 6

TBQ no tratado	Concentración AFP (ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
Cuentas	737	22.413	190.157	1.204.985	2.201.469
	689	25.275	205.970	874.704	1.396.455
	822	30.756	199.645	932.275	2.335.765
	824	30.605	205.809	816.211	2.214.843
	859	33.443	189.985	946.657	1.430.978

ES 2 575 902 T3

	853	22.297	196.053	1.064.297	1.374.801
Promedio	797	27.465	197.937	973.188	1.825.719
CV	8,6%	17,3%	3,6%	14,4%	25,6%
TBQ tratado con sulfito sódico					
	Concentración AFP (ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
Cuentas	354	17.298	165.651	1.230.392	2.391.362
	380	17.595	166.482	1.236.687	2.514.891
	370	17.634	167.006	1.245.664	2.397.218
	385	17.515	167.636	1.192.276	2.515.427
	381	17.557	166.714	1.191.075	2.442.702
	371	16.806	164.900	1.216.407	2.540.877
Promedio	374	17.401	166.398	1.218.750	2.467.080
CV	3,0%	1,8%	0,6%	1,9%	2,6%

Ejemplo 5: Efecto del TBQ no tratado y del TBQ oxidado/reducido en el inmunoensayo de quimioluminiscencia (2)

5 A 300 ml de una solución de TBQ 35,2 mg/ml, se añadió 15 ml de una solución de sulfito-HCl sódico 1M (pH 6,0), se mezcló y se dejó reaccionar a 25 °C durante 24 horas. Después, esta fue distribuida en una membrana de diálisis (corte de pesos moleculares entre 12.000 y 14.000, suministrada por Sanko Junyaku Co., Ltd.), y la diálisis fue realizada usando agua MilliQ como solución externa para hacer el TBQ tratado. Después, se preparó una solución de AMPPD 0,2 mg/ml (DEA 0,1M, MgCl₂ 1mM, 0,05% NaN₃, pH 10,0) que contiene 0,8 mg/ml de TBQ no tratado o TBQ tratado (solución sustrato). Como en el ejemplo 4 anterior, usando α -fetoproteína como una muestra de ensayo, se realizó un inmunoensayo, y la quimioluminiscencia (señal) se contó para realizar una medición. El resultado se muestra en la tabla 7. Comparado los casos de TBQ no tratado, la repetibilidad (valor CV) usando TBQ tratada con sulfito sódico fue mejorada.

Tabla 7

TBQ no tratado					
	Concentración AFP (ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
Cuentas	549	37.542	188.792	1.064.676	1.714.369
	560	38.510	219.614	908.606	1.985371
	609	41.285	212.975	958.981	1.866.508
	551	38.169	207.767	1.051.242	1.464.529
	505	41.844	232.717	983.756	1.498.278
	472	27.779	211.984	1.054.501	1.684.947
Promedio	541	37.522	212.308	1.003.627	1.702.334
CV	8,8%	13,5%	6,8%	6,3%	11,9%
TBQ tratado con sulfito sódico					
	Concentración AFP (ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
Cuentas	374	27.079	234.281	1.140.508	2.163.595
	380	25.361	233.081	1.160.725	1.925.163
	362	27.141	220.616	1.153.611	2.031.717
	363	25.705	228.368	1.117.495	2.060.136
	426	27.389	221.167	1.104.866	1.978.776
	399	24.851	227.564	1.130.180	2.036.848
Promedio	384	26.254	227.513	1.134.564	2.032.706
CV	6,4%	4,1%	2,5%	1,9%	4,0%

Ejemplo 6: Efecto del BDMQ no tratado y el BDMQ oxidado/reducido en el inmunoensayo de quimioluminiscencia

A 10 ml de una solución de BDMQ (25,4 mg/ml), se añadió 0,5 ml de una solución de sulfito sódico-HCl 1M (pH 6,0) se mezcló y se dejó reaccionar a 25 °C durante 24 horas. Después, esta fue distribuida en una membrana de diálisis (corte de pesos moleculares entre 12.000 y 14.000, suministrada por Sanko Junyaku Co., Ltd.), y se realizó la diálisis usando agua MilliQ como una solución externa para hacer un BDMQ tratado.

- 5 Después, se preparó una solución de AMPPD 0,2 mg/ml [dietanolamina (DEA) 0,1M, cloruro magnésico (MgCl₂) 1mM, 0,05% de azida sódica (NaN₃), pH 10,0] conteniendo 0,4 mg/ml de BDMQ no tratado o BDMQ tratado (solución sustrato).

- 10 Muestras de ensayo conteniendo 0, 10, 100, 800 y 2000 ng/ml de α-fetoproteína (AFP) fueron diluidos hasta 10 veces con una solución de BSA. Cada ensayo medido (20 µl) fue suministrado al reactor en el cual 250 µl de 0,015% anticuerpos anti-AFP-unido a partículas magnéticas, fueron colocados y reaccionaron a 37 °C durante 10 min. Después, las partículas fueron atraídas por un imán colocando el imán cerca del reactor para eliminar el sobrenadante y lavar. Después, se añadieron 250 µl de 0,1 µg/ml de ALP conjugado con anticuerpo anti-AFP se mezcló y se dejó reaccionar a 37 °C durante 10 min. Después de la reacción, las partículas fueron atraídas por un imán colocando el imán cerca del reactor, el sobrenadante fue eliminado y lavado. La solución de sustrato anterior (200 µl) se añadió a estas partículas, se mezcló y se dejó reaccionar a 37 °C durante 5 min. Después, la quimioluminiscencia (señal) fue contada con un contador de fotones (suministrado por Hamamatsu Photonics K. K.), y se calculó un valor integrado para dos segundos. El resultado se muestra en la tabla 8. Comparado los casos de BDMQ no tratado, la repetibilidad (valor CV) usando BDMQ tratado con sulfito sódico fue mejorada.

Tabla 8

BDMQ no tratado					
	Concentración AFP (ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
Cuentas	235	29.915	200.489	860.407	1.600.060
	242	30.126	203.080	904.037	1.735.060
	222	29.949	198.255	891.405	1.759.976
	242	29.466	208.122	935.003	1.512.594
Promedio	235	29.864	202.487	897.713	1.651.923
CV	4,00%	0,90%	2,10%	3,40%	7,10%
BDMQ tratado con sulfito sódico					
	Concentración AFP (ng/ml)				
	0	10	100	800	2000
Cuentas	201	24.969	198.765	1.212.549	2.354.980
	212	25.586	195.978	1.210.283	2.371.754
	207	25.043	196.434	1.213.840	2.339.963
	184	25.086	195.111	1.219.413	2.371.016
Promedio	201	29.864	202.487	897.713	1.651.923
CV	6,10%	0,90%	0,80%	0,40%	0,90%

20

Ejemplo 7: Efecto del BDMQ no tratado y BDMQ oxidado/reducido sobre la dispersión de partículas

- 25 A 10 ml de un solución de BDQM (25,4 mg/ml) se añadió 0,5 ml de una solución de sulfito sódico-HCl, se mezcló y se dejó reaccionar a 25 °C durante 24 horas. Después, ésta fue distribuida en una membrana de diálisis (corte de pesos moleculares entre 12.000 y 14.000, suministrada por Sanko Junyaku Co., Ltd.), y la diálisis fue realizada usando agua MilliQ como una solución externa para hacer el BDMQ tratado.

- 30 Después, se preparó DEA 0,1M (pH 10,0) conteniendo 0,4 mg/ml de BDMQ no tratado o BDMQ tratado. Entonces 100 µl de partículas magnéticas 0,03% se suministraron a un reactor, y las partículas fueron atraídas por un imán poniendo el imán cerca de las partículas, y el sobrenadante fue eliminado. La solución DEA (200 µl) que incluye el BDMQ anterior se añadió y se agitó durante 30 segundos. Quince segundos después de la agitación, se cogieron 150 µl de la superficie de la solución con una Pipetman (suministrada por Gilson, una micropipeta), se distribuyó en la célula para el espectrofotómetro, y después de 10 segundos, una turbidez (OD500) se midió con el espectrofotómetro (UV-1.200), suministrado por Shimadzu Corporation). Este resultado se muestra en la tabla 9. Comparando con BDMQ no tratado en el grupo BDMQ tratado, la turbidez es más alta y la dispersión de las partículas fue mejorada.

35

Tabla 9

	BDMQ no tratado	BDMQ tratado
Turbidez	0,045	0,339

Efectos de la Invención

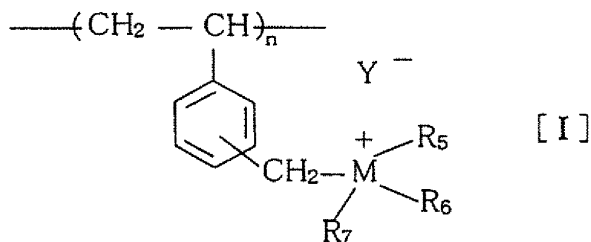
- 5 Como se indica anteriormente, por tratamiento con un agente oxidante o un agente reductor, se ha proporcionado un potenciador de quimioluminiscencia que es utilizado para la detección de la señal en el inmunoensayo en fase sólida, utilizando el antígeno o/y el anticuerpo inmovilizado en el portador sólido fino dispersable en el medio líquido, mejorando la dispersibilidad de los portadores sólidos finos comparados con los potenciadores de quimioluminiscencia convencionales, y es excelente en la mejora de la quimioluminiscencia por reacción enzimática del sustrato quimioluminiscente que contiene dioxetano. Asimismo, se ha descrito el método de quimioluminiscencia y el kit utilizado por el potenciador de quimioluminiscencia. Cuando se usa el potenciador de quimioluminiscencia del inmunoensayo reivindicado, la reproducibilidad entre las series de los valores medidos es mejorada y se hace posible una cuantificación mas precisa.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoensayo en fase sólida que utiliza un antígeno o/y anticuerpo inmovilizado sobre portadores sólidos finos dispersables en un medio líquido, que comprende

5 un método de quimioluminiscencia utilizado para la detección de la señal que comprende hacer reaccionar un sustrato quimioluminiscente que tiene dioxetano con fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, glucosidasa, glucouronidasa o esterasa como enzima de un cuerpo marcado en presencia de un potenciador de quimioluminiscencia,

donde el potenciador de quimioluminiscencia es uno que se ha obtenido por tratamiento de un polímero soluble en agua representado por la siguiente fórmula general (I).



10 donde,

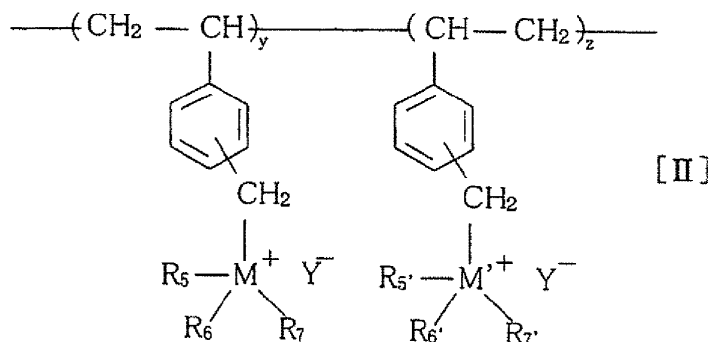
15 cada R_5 , R_6 y R_7 es un grupo alquilo no sustituido lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono; un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono sustituido con uno o más de un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo ariloxi, un grupo amino, un grupo amino sustituido, un grupo amido o un grupo ureido; un grupo fluoroalcano; un grupo fluoroarilo; un grupo monocicloalquilo no sustituido que tiene de 3 a 12 átomos de carbono en el anillo; un grupo monocicloalquilo sustituido que tiene de 3 a 12 átomos de carbono en el anillo sustituido con uno o más de un grupo alquilo, alcoxi o grupo benzo condensado; un grupo policicloalquilo que tiene dos o mas anillos condensados y cada uno tiene de 5 a 12 átomos de carbono, que están no sustituidos o sustituidos con uno o más de un grupo alquilo, un grupo alcoxi o un grupo arilo; un grupo arilo, un grupo alcarilo o un grupo aralquilo teniendo al menos un anillo y en total de 6 a 20 átomos de carbono, que esta no sustituido o sustituido con uno o más de un grupo alquilo, un grupo arilo, flúor o un grupo hidroxilo, o al menos dos de R_5 , R_6 y R_7 son grupos capaces de formar junto con el átomo cuaternario al que están unidos un anillo saturado o insaturado, no sustituido o sustituido que tiene de 3 a 5 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos y que contiene nitrógeno, fósforo o azufre, al que puede estar condensado un anillo de benceno.

20 Y solo o en combinación representa un contraión seleccionado de un grupo que consiste en un ión halógeno, un ión sulfato, un ión alquil sulfonato, un ión aril sulfonato, un ión aril sulfonato sustituido, un ión difenilantraceno sulfonato, un ión perclorato, un ión alcanato, un ión aril carboxilato, un ión benceno aril heterocíclico carboxilato y dianiones orgánicos,

30 n representa un número dentro del intervalo entre 500 y 500.000 (promedio de pesos moleculares), que es medido utilizando un método de viscosidad intrínseca o un método LALLS,

M es nitrógeno o fósforo,

o el copolímero soluble en agua de fórmula (II):



35 donde Y, M' , R_5' , R_6' y R_7' son los mismos Y, M, R_5 , R_6 y R_7 definidos anteriormente e y z representan una fracción molar de un monómero individual que constituye el copolímero

con un agente oxidante o un agente reductor, inhibiendo de este modo la conglomeración de los portadores sólidos finos,

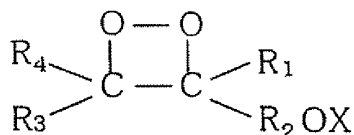
donde el agente oxidante y el agente reductor es seleccionado de un grupo que consiste en persulfato amónico, sulfito sódico, hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, metaperyodato sódico, permanganato potásico y dicromato potásico.

5 2. El inmunoensayo en fase sólida de acuerdo con la reivindicación 1, donde los transportadores sólidos finos son partículas.

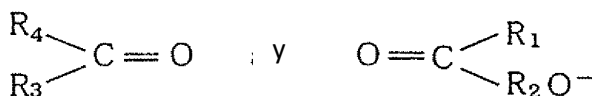
3. El inmunoensayo en fase sólida de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde los transportadores sólidos finos son partículas magnéticas.

10 4. El inmunoensayo en fase sólida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, donde el potenciador de quimioluminiscencia no comprende un componente con un peso molecular mayor de 400.000 Daltons medido por un método de ultrafiltración.

5. El inmunoensayo en fase sólida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, donde el sustrato de quimioluminiscencia que tiene dioxetano es un sustrato representado por la fórmula general:



15 donde R₂ es un grupo arilo sustituido con un grupo X-oxi, que forma el compuesto 1,2-dioxetano que es un óxido intermedio inestable donde X es eliminado por un activador seleccionado de un ácido, base, enzima, catalizador orgánico o inorgánico y donador de electrones para inducir una reacción, en la que el compuesto 1,2-dioxetano inestable es descompuesto con liberación de la energía electrónica para producir luz y dos compuestos que contienen un grupo carbonilo de fórmula general:



20 Y X es un grupo químico fácilmente reactivo que es eliminado por un enzima; R₁ es uno seleccionado del grupo que consiste en un grupo alquilo, un grupo alcoxi, un grupo ariloxi, un grupo dialquil amino, un grupo trialquil sililoxi, un grupo aril sililoxi, un grupo arilo y un grupo arilo que está unido a un grupo arilo R₂ para formar un grupo arilo policíclico con la sustitución de un grupo X-oxi, que está espiro unido a un anillo de 1,2-dioxetano; R₃ y R₄ son cada uno un grupo alquilo o un grupo heteroalquilo, o R₃ y R₄ pueden estar juntos unidos para formar un grupo alquilenos policíclico espiro unido al anillo de 1,2-dioxetano.

30 6. El inmunoensayo en fase sólida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde los polímeros de fórmula (1) son seleccionados de un grupo que consiste en cloruro de poli[vinilbencil(bencil dimetil amonio)], cloruro de poli(vinilbenciltrimetil amonio), cloruro de poli[vinilbencil(tributil amonio)], cloruro de bencilmetilcetil amonio, cloruro de polimetilacrilamidapropilmetil amonio, cloruro de poli[vinilbencil(trietil amonio)], cloruro de poli[vinilbencil(2-bencilamino)etildimetil amonio], cloruro de poli[vinilbencil dimetil(2-hidroxi)etil amonio], cloruro de poli[vinilbencil(trimetil fosfonio)], cloruro de poli[vinilbencil(tributil fosfonio)] y cloruro de poli[vinilbencil(trioctil fosfonio)] y copolímeros de éstos.