

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 553**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/66** (2006.01)

**G01N 21/76** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2011** **E 11774051 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2633289**

54 Título: **Utilización de compuestos potenciadores de la señal en la detección electroquimioluminiscente**

30 Prioridad:

**22.11.2010 EP 10192106**

**25.10.2010 EP 10188716**

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

**06.09.2016**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**

**Grenzacherstrasse 124**

**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**STOECKEL, JOHANNES;**

**WINDFUHR, MICHAELA;**

**FINKE, ANDREAS y**

**HAUPTMANN, BERNHARD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 581 553 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**

Utilización de compuestos potenciadores de la señal en la detección electroquimioluminiscente

5 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para la detección de un analito en una muestra mediante electroquimioluminiscencia utilizando nuevas composiciones de reactivos. Se dan a conocer nuevas composiciones de reactivos, kits de reactivos para medir la electroquimioluminiscencia (ELC) y métodos de detección de electroquimioluminiscencia utilizando las nuevas composiciones de reactivos. En particular, la invención se refiere a la utilización de nuevas combinaciones de compuestos que pueden utilizarse en dichas mediciones para proporcionar un rendimiento de ensayo mejorado.

15 Antecedentes y técnica anterior

Se conocen métodos para medir los fenómenos electroquimioluminiscentes desde hace años. Dichos métodos utilizan la capacidad de algunos complejos metálicos especiales de alcanzar, mediante oxidación, un estado excitado del que se degradan al estado fundamental emitiendo electroquimioluminiscencia. Para una revisión ver Richter M.M., Chem. Rev. 104:3003-3036, 2004.

20 Actualmente existen varios instrumentos disponibles comercialmente que utilizan la electroquimioluminiscencia (ELC) para mediciones analíticas. Las especies que pueden ser inducidas a emitir ELC (especies activas para ELC) han sido utilizadas como marcajes ELC. Entre los ejemplos de marcajes ELC se incluyen compuestos organometálicos tales como la fracción tris-bipiridil-rutenio (RuBpy), en la que el metal es de, por ejemplo, los metales de los grupos VII y VIII, incluyendo Re, Ru, Ir y Os. Las especies que reaccionan con el marcaje ELC en el proceso de ELC se denominan en la presente memoria co-reativos de ELC. Entre los co-reativos utilizados comúnmente para la ELC se incluyen las aminas terciarias (por ejemplo la tripropilamina (TPA)), el oxalato y el persulfato. La luz es generada por los marcajes o ligandos de ELC; puede realizarse un seguimiento de la participación del reactivo de unión en una interacción de unión mediante la medición de la ELC emitida por el marcaje ELC. Alternativamente, la señal ELC procedente de un compuesto activo para ELC puede ser indicativa del medio químico (ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.641.623 y nº 5.643.713, que describen ensayos de ELC que monitorizan la presencia o la destrucción de co-reativos de ELC especiales). Para más antecedentes sobre la ELC, los marcajes ELC, los ensayos y la instrumentación de ELC para la realización de ensayos de ELC, ver las patentes US nº 5.093.268, nº 5.147.806, nº 5.240.863, nº 5.308.754, nº 5.324.457, nº 5.591.581, nº 5.597.910, nº 5.679.519, nº 5.705.402, nº 5.731.147, nº 5.786.141, nº 5.846.485, nº 5.866.434, nº 6.066.448, nº 6.136.268 y nº 6.207.369 y la patente EP nº 0 441 875, y las solicitudes publicadas de patente PCT nº WO97/36931, nº WO98/12539, nº WO99/14599, nº WO99/32662, nº WO99/58962, nº WO99/63347, nº WO00/03233 y nº WO98/57154.

40 La patente US nº 5.677.192 (Klemt V. et al.) da a conocer un método para medir un analito en una muestra mediante detección de electroquimioluminiscencia utilizando anticuerpos biotinilados con cloracetamida (CAA) como conservante en el tampón de almacenamiento de los anticuerpos. Sin embargo, la CAA es eliminada mediante lavado en el ensayo antes de que se produzca la detección de la ELC.

45 La patente US nº 4.022.456 (Maas W. et al.) da a conocer composiciones que comprenden acetamida, ácido bórico y un co-reactivo utilizado como agentes potenciadores del crecimiento vegetal.

50 Los instrumentos de ELC disponibles comercialmente han demostrado un rendimiento excepcional. Se utilizan ampliamente por motivos entre los que se incluyen sus excelentes sensibilidad, rango dinámico, precisión y tolerancia de matrices complejas de muestras. La instrumentación disponible comercialmente utiliza diseños basados en celdas con celdas de flujo reutilizables permanentes.

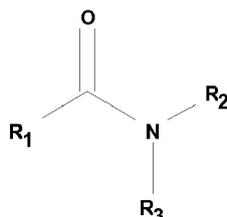
55 Los volúmenes de muestra disponibles para la determinación de los analitos con frecuencia se encuentran limitados y resulta necesario determinar un número creciente de analitos a partir de una sola muestra. Además, se requiere desarrollar equipos de laboratorio más rápidos para la automatización de los ensayos y métodos más sensibles para la detección de los analitos. Lo anterior conduce a la necesidad de ensayos electroquimioluminiscentes de alta sensibilidad y específicos, y métodos para llevarlos a cabo. Además, deberían considerarse mejoras asociadas a riesgos de seguridad o cuestiones medioambientales.

60 Sin embargo, resultaría muy ventajosa una detección todavía más sensibles de los analitos. De esta manera, el objetivo de la presente invención es mejorar dichos métodos y composiciones de reactivos conocidos, especialmente con respecto al incremento de la señal de ELC y una detección mejorada de los analitos en combinación con los procedimientos electroquimioluminiscentes. Resultaría deseable encontrar nuevos reactivos y/o compuestos potenciadores de la señal con un rendimiento mejorado en los ensayos electroquimioluminiscentes.

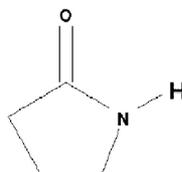
65

Descripción resumida de la invención

La presente invención en una realización se refiere a un método para medir un analito en una muestra mediante la detección electroquimioluminiscente, que comprende las etapas de: a) incubar la muestra con un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente, b) separar el reactivo de detección marcado unido a analito y separado del analito, c) incubar el reactivo de detección marcado que se ha separado, con una composición de reactivos que comprende: i) por lo menos un co-reactivo, e ii) por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas del ácido carbónico de fórmulas I y II,

**Fórmula I**

con  $\text{R}_1 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{F}, \text{CH}_2\text{Cl}, \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CHClCH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}, \text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CClHCH}_2\text{CH}_3$  o  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , con  $\text{R}_2 = \text{H}$ , y con  $\text{R}_3 = \text{H}$ ,

**Fórmula II,**

d) inducir electroquímicamente la liberación de luminiscencia, y e) determinar la señal de electroquimioluminiscencia (ELC), midiendo de esta manera el analito.

La presente invención se refiere además a una composición de reactivos para determinar la ELC, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo.

La presente invención se refiere además a una mezcla de reactivos, que comprende una composición de reactivos para determinar la ELC, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, una muestra que debe investigarse y por lo menos un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente.

La presente invención se refiere además a un kit para medir la ELC, que contiene una composición de reactivos para determinar la ELC, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo.

La invención, así como objetivos, características y ventajas adicionales de la misma, se entenderán más completamente a partir de la descripción detallada siguiente de determinadas realizaciones preferentes.

Descripción detallada

La práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura, tal como en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook et al., 1989; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984)); Animal Cell Culture (R.L. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); Ausubel, F.M., et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology (1987) y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis et al., editores, 1994).

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Singleton, et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2a ed., John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1994; March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 4a ed., John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1992; Lewin, B., Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994, ISBN 0-19-854287-9; Kendrew, J., et al. (editores), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994, ISBN 0-632-02182-9; y Meyers, R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc. (1995), ISBN 1-56081-569 8) que proporcionan al experto en la materia una guía general de muchos de los términos y expresiones utilizados en la presente solicitud.

Todas las referencias citadas en la presente memoria, incluyendo solicitudes y publicaciones de patente, se incorporan como referencia en su totalidad.

Definiciones:

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, cada uno de los términos siguientes presenta el significado asociado al mismo en la presente sección.

10 Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, "un analito" se refiere a un analito o a más de un analito. El término "por lo menos" se utiliza para indicar que opcionalmente puede encontrarse presente uno o más objetos adicionales. A título de ejemplo, una matriz que comprende por lo menos dos áreas discretas puede comprender opcionalmente dos o más áreas de ensayo discretas.

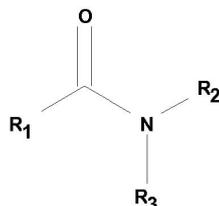
15 La expresión "uno o más" se refiere a 1 a 50, preferentemente 1 a 20, resultando preferentes también 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ó 15.

En la Tabla 1 se listan ejemplos de "amidas de ácido carbónico" y sus estructuras químicas.

20 Tabla 1: las amidas del ácido carbónico presentan la estructura común siguiente, a menos que se indique lo contrario:

Nº	Nombre de índice CA	nº CAS	estructura	Residuos
1	formamida	75-122-7		$R_1 = H \ R_2 = H \ R_3 = H$
2	acetamida	60-35-5	Ver anteriormente	$R_1 = CH_3 \ R_2 = H \ R_3 = H$
3	2-fluoroacetamida	640-19-7	Ver anteriormente	$R_3 = CH_2F \ R_2 = H \ R_1 = H$
4	2,2,2-trifluoroacetamida	354-38-1	Ver anteriormente	$R_1 = CF_3 \ R_2 = H \ R_3 = H$
5	2-cloroacetamida	79-07-2	ver anteriormente	$R_1 = CH_2Cl \ R_2 = H \ R_3 = H$
6	2,2-dicloroacetamida	68372-7	ver anteriormente	$R_1 = CHCl_2 \ R_2 = H \ R_3 = H$
7	2-bromoacetamida	683-57-8	ver anteriormente	$R_1 = CH_2Br \ R_2 = H \ R_3 = H$
8	2-yodoacetamida	144-48-9	ver anteriormente	$R_1 = CH_2I \ R_2 = H \ R_3 = H$
9	2-hidroxiacetamida	598-42-5	ver anteriormente	$R_1 = CH_2OH \ R_2 = H \ R_3 = H$
10	acetoacetamida	5977-14-0	ver anteriormente	$R_1 = CH_2COCH_3 \ R_2 = H \ R_3 = H$
11	2-cloro-N,N-dimetilacetamida	2675-89-0	ver anteriormente	$R_1 = CH_2Cl \ R_2 = CH_3 \ R_3 = CH_3$
12	2-cloro-N-hidroxi-metilacetamida	2832-19-1	ver anteriormente	$R_1 = CH_2Cl \ R_2 = CH_2OH \ R_3 = H$
13	2-cloro-N-metoxi-N-metilacetamida	67442-07-3	ver anteriormente	$R_1 = CH_2Cl \ R_2 = CH_3 \ R_3 = OCH_3$
14	propanamida(propionamida)	79-05-0	ver anteriormente	$R_1 = CH_2CH_3 \ R_2 = H \ R_3 = H$
15	2-cloropropanamida	27816-36-0	ver anteriormente	$R_1 = CHClCH_3 \ R_2 = H \ R_3 = H$
16	3-cloropropanamida	5875-24-1	ver anteriormente	$R_1 = CH_2CH_2Cl \ R_2 = H \ R_3 = H$
17	N-metilpropanamida	1187-58-2	ver anteriormente	$R_1 = CH_2CH_3 \ R_2 = CH_3 \ R_3 = H$
18	2,2-dimetil-propanamida	754-10-9	ver anteriormente	$R_1 = C(CH_3)_2CH_3 \ R_2 = H \ R_3 = H$
19	propanodiamida	108-13-4	ver anteriormente	$R_1 = CH_2CONH_2 \ R_2 = H \ R_3 = H$
20	Butanamida	541-35-5	ver anteriormente	$R_1 = CH_2CH_2CH_3 \ R_2 = H \ R_3 = H$
21	2-clorobutanamida	2455-04-1	ver anteriormente	$R_1 = CClHCH_2CH_3 \ R_2 = H \ R_3 = H$
22	Pentanamida	626-97-1	ver anteriormente	$R_1 = CH_2CH_2CH_2CH_3 \ R_2 = H \ R_3 = H$
23	Hexanamida	628-02-4	ver anteriormente	$R_1 = CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3 \ R_2 = H \ R_3 = H$
24	2-pirrolidinona	616-45-5		
25	2,5-butanimida	123-56-8		

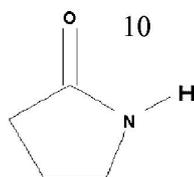
La formula I tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a:



- 5 en la que  $R_1 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{F}, \text{CH}_2\text{Cl}, \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CHClCH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}, \text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CClHCH}_2\text{CH}_3$  o  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , y en la que  $R_2 = \text{H}$ , y en la que  $R_3 = \text{H}$ .

La fórmula II tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la estructura siguiente denominada 2-pirrolidiona, representada en la Tabla 1 como nº 24.

10



15

20

25

30

Las realizaciones de la invención pueden utilizarse para someter a ensayo una diversidad de muestras que pueden contener un analito o actividad de interés. Dichas muestras pueden encontrarse en forma sólida, de emulsión, de suspensión, líquida o gaseosa. Pueden ser, aunque sin limitarse a ellas, muestras que contiene o se derivan de seres humanos o animales, por ejemplo células (vivas o muertas) y productos derivados de células, células inmortalizadas, fragmentos celulares, fracciones celulares, lisados celulares, orgánulos, membranas celulares, hibridomas, sobrenadantes de cultivo celular (incluyendo sobrenadantes de organismos productores de anticuerpos, tales como hibridomas), agua residual o potable, alimentos, bebidas, composiciones farmacéuticas, sangre, suero, plasma, pelo, sudor, orina, heces, excrementos, saliva, tejido, biopsias, efluente, muestras separadas y/o fraccionadas, líquidos separados y/o fraccionados, órganos, plantas, partes de plantas, productos secundarios vegetales, suelo, agua, suministro de agua, fuentes de agua, residuo filtrado de fluidos (gases y líquidos), toallitas, materiales absorbentes, geles, citoesqueleto, muestras no fraccionadas, lisados celulares no fraccionados, núcleo/núcleos celulares, fracciones nucleares, compuestos químicos, soluciones químicas, componentes biológicos estructurales, componentes esqueléticos (ligamentos, tendones), componentes esqueléticos separados y/o fraccionados, fracciones y/o separaciones de pelo, piel, muestras de piel, fracciones de piel, dermis, endodermis, células eucarióticas, células procarióticas, hongos, levaduras, células inmunológicas, fármacos, fármacos terapéuticos, aceites, extractos, mucosas, aguas residuales, muestras ambientales, solventes orgánicos o aire. En una realización, la muestra puede comprender además, por ejemplo, agua, alcoholes, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, n-metil-pirrolidona, metanol u otros solventes orgánicos.

35

Una "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se obtiene con el fin de una evaluación in vitro. Tal como apreciará el experto en la materia, cualquiera de dichas evaluaciones se realiza in vitro. En el caso de que la muestra sea una muestra de un paciente, se desecha posteriormente. La muestra del paciente se utiliza únicamente para el método diagnóstico in vitro de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere nuevamente al cuerpo del paciente.

40

45

50

Entre los analitos que pueden medirse se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, células completas, antígenos de superficie celular, complejos de proteínas, factores y/o componentes de señalización celular, segundos mensajeros, factores y/o componentes de señalización de segundo mensajero, partículas subcelulares (por ejemplo orgánulos o fragmentos de membranas), virus, priones, ácaros o fragmentos de los mismos, viroides, factores inmunológicos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, antígenos, haptenos, ácidos grasos, ácidos nucleicos (y análogos sintéticos), ribosomas, proteínas (y análogos sintéticos), lipoproteínas, polisacáridos, inhibidores, cofactores, haptenos, receptores celulares, ligandos de receptor, lipopolisacáridos, glucoproteínas, péptidos, polipéptidos, enzimas, sustratos enzimáticos, productos enzimáticos, enzimas de procesamiento de ácidos nucleicos (por ejemplo polimerasas, nucleasas, integrasas, ligasas, helicasas, telomerasas, etc.), enzimas de procesamiento de proteínas (por ejemplo proteasas, quinasas, proteína fosfatasa, ligasas de proteína ubiquitina, etc.), metabolitos celulares, factores endocrinos, factores paracrininos, factores autocrinos, citoquinas, hormonas, agentes farmacológicos, fármacos, fármacos terapéuticos, moléculas orgánicas sintéticas, moléculas organometálicas, tranquilizantes, barbitúricos, alcaloides, esteroides, vitaminas, aminoácidos, azúcares, lectinas, proteínas recombinantes o derivadas, biotina, avidina, estreptavidina o moléculas inorgánicas presentes en la muestra.

Las células completas pueden ser animales, vegetales o bacterias, y pueden ser viables o muertas. Entre los ejemplos se incluyen patógenos vegetales tales como hongos y nemátodos. La expresión "partículas subcelulares" pretende comprender, por ejemplo, orgánulos subcelulares, partículas membranales, tal como procedentes de células rotas, fragmentos de paredes celulares, ribosomas, complejos multienzimáticos y otras partículas que pueden obtenerse de organismos vivos. Entre los ácidos nucleicos se incluyen, por ejemplo, ADN cromosómico, ADN plasmídico, ADN vírico y ADN recombinante obtenido de múltiples fuentes. Entre los ácidos nucleicos se incluyen además los ARN, por ejemplo los ARN mensajeros, los ARN ribosómicos y los ARN transferentes. Entre los polipéptidos se incluyen, por ejemplo, enzimas, proteínas de transporte, proteínas receptoras y proteínas estructurales, tales como proteínas de cubierta vírica. Los polipéptidos preferentes son enzimas y anticuerpos. Los polipéptidos particularmente preferentes son los anticuerpos monoclonales. Entre las hormonas se incluyen, por ejemplo, la insulina y la hormona tiroidea T4. Entre los agentes farmacológicos se incluyen, por ejemplo, los glucósidos cardíacos. Evidentemente se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención incluir sustancias sintéticas que son químicamente similares a materiales biológicos, tales como polipéptidos sintéticos, ácidos nucleicos sintéticos y membranas sintéticas, vesículas y liposomas. Lo anterior no pretende ser una lista completa de las sustancias biológicas adecuadas para la utilización en la presente invención, sino que únicamente pretende ser ilustrativa del amplio alcance de la invención.

Además, típicamente el analito de interés se encuentra presente a una concentración de  $10^{-3}$  molar o inferior, por ejemplo por lo menos de tan sólo  $10^{-18}$  molar.

La expresión "reactivo específico de analito" (REA) según la presente invención debe entenderse como una molécula o biomolécula (por ejemplo una proteína o anticuerpo) con la capacidad de unirse específicamente al analito. Los "reactivos específicos de analito" (REA) son una clase de moléculas biológicas que pueden utilizarse para identificar y medir la cantidad de una sustancia química individual en especímenes biológicos. Los REA son, por ejemplo, anticuerpos, tanto policlonales como monoclonales, proteínas receptoras específicas, ligandos, secuencias de ácidos nucleicos y reactivos similares que, mediante una unión específica o una reacción química con sustancias en un espécimen, están destinadas a la utilización en una aplicación diagnóstica para la identificación y cuantificación de una sustancia química o ligando individual en especímenes biológicos. En términos simples, un reactivo específico de analito es el ingrediente activo de un ensayo. Un REA satisfará tanto los criterios de afinidad como los de especificidad de unión del analito.

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos. El término "anticuerpo" comprende las diversas formas de estructura de anticuerpo, incluyendo anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpo. El anticuerpo según la invención es, en una realización, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo derivado de otras especies animales, tales como el ratón, la cabra o la oveja, un anticuerpo monoclonal o policlonal, o un anticuerpo con agotamiento de antígeno de células T. La ingeniería genética de los anticuerpos se describe en, por ejemplo, Morrison S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855, 1984, patentes US nº 5.202.238 y nº 5.204.244; Riechmann L. et al., Nature 332:323-327, 1988, y Neuberger M.S. et al., Nature 314:268-270, 1985; Lonberg N., Nat. Biotechnol. 23:1117-1125, 2005.

Puede utilizarse cualquier fragmento de anticuerpo que satisfaga los criterios anteriormente indicados para un reactivo específico de analito. Los anticuerpos se generan mediante procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo tal como se describen en Tijssen (Tijssen P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, la totalidad de la obra, especialmente las páginas 43 a 78). Además, el experto en la materia conoce perfectamente los métodos basados en inmunosorbentes que pueden utilizarse para el aislamiento específico de anticuerpos. Mediante dichos métodos puede mejorarse la calidad de los anticuerpos y por lo tanto su rendimiento en inmunoensayos (Tijssen P., supra, páginas 108 a 115).

Un "reactivo de detección" según la presente invención comprende un reactivo específico de analito (REA) marcado con un grupo electroquimioluminiscente, o un homólogo de analito marcado con un grupo electroquimioluminiscente. Según el formato de ensayo, es conocido por el experto en la materia qué reactivo de detección debe seleccionarse para los diversos formatos de ensayo (por ejemplo un ensayo de tipo sándwich, un ensayo de puente de doble antígeno (EPDA), un ensayo competitivo, un ensayo homogéneo y un ensayo heterogéneo). Un reactivo de detección en un inmunoensayo heterogéneo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo. Es conocido por el experto en la materia que el reactivo de detección puede inmovilizarse sobre una fase sólida. En una realización, el método para medir un analito en una muestra mediante detección electroquimioluminiscente puede llevarse a cabo como ensayo homogéneo. En una realización, el método puede llevarse a cabo como ensayo heterogéneo. En una realización, el método puede llevarse a cabo en un formato de ensayo de tipo sándwich. En una realización, el método puede llevarse a cabo en un formato de ensayo competitivo. También en una realización, el método puede llevarse a cabo en un formato de ensayo de puente de doble antígeno (EPDA). Se describen en detalle los formatos de inmunoensayo conocidos en la obra de Price C.P. y Newman D.J., Principles and Practice of Immunoassay, 2a ed., 1997.

El término "marcaje" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier sustancia que es capaz de producir una señal detectable, visiblemente o mediante la utilización de instrumentación adecuada. Entre los diversos marcajes adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cromógenos, compuestos fluorescentes, quimioluminiscentes o electroquimioluminiscentes, catalizadores, enzimas, sustratos enzimáticos, pigmentos, partículas metálicas y no metálicas coloidales y partículas de látex y polímero orgánico.

El término "luminiscencia" se refiere a cualquier emisión de luz que no obtenga energía de la temperatura de una fuente energética (por ejemplo una fuente de radiación electromagnética, una reacción química o energía mecánica). En general, la fuente provoca que un electrón de un átomo se desplace de un estado de energía más bajo a un estado de energía más alto "excitado"; entonces el electrón libera esa energía en forma de luz emitida al retornar a un estado de energía más bajo. Dicha emisión de luz habitualmente se produce en el rango visible o próximo al visible del espectro electromagnético. El término "luminiscencia" incluye, aunque sin limitarse a ellos, fenómenos de emisión lumínica tales como la fosforescencia, la fluorescencia, la bioluminiscencia, la radioluminiscencia, la electroluminiscencia, la electroquimioluminiscencia y la termoluminiscencia.

La expresión "marcaje luminiscente" se refiere a un marcaje que genera una señal luminiscente, por ejemplo una emisión de luz que no deriva energía de la temperatura de la fuente emisora. El marcaje luminiscente puede ser, por ejemplo, una molécula fluorescente, una molécula fosforescente, una molécula radioluminiscente, un quelato luminiscente, un compuesto de fósforo o que contiene fósforo, o un punto cuántico.

Un "ensayo de electroquimioluminiscencia" o "EEQL" es un ensayo electroquímico en el que la molécula de analito unida se detecta con un marcaje unido a un agente de detección (molécula diana). Un electrodo inicia electroquímicamente la luminiscencia de un marcaje químico unido a un agente de detección. La luz emitida por el marcaje se mide con un fotodetector e indica la presencia o cantidad de complejos de molécula de analito/molécula diana unidos. Los métodos ECLA se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 5.543.112, nº 5.935.779 y nº 6.316.607. La modulación de la señal puede maximizarse para diferentes concentraciones de molécula de analito para conseguir mediciones precisas y sensibles.

En un procedimiento de EEQL pueden suspenderse micropartículas en la muestra para la unión eficiente al analito. Por ejemplo, las partículas pueden presentar un diámetro de entre 0,05 µm y 200 µm, de entre 0,1 µm y 100 µm, o de entre 0,5 µm y 10 µm, y un componente de superficie capaz de unirse a una molécula de analito. En un sistema de EEQL utilizado frecuentemente (Elecys, Roche Diagnostics, Alemania), las micropartículas presentan un diámetro de aproximadamente 3 µm. Las micropartículas pueden estar formadas de almidón entrecruzado, dextrano, celulosa, proteína, polímeros orgánicos, copolímero de estireno, tal como copolímero de estireno/butadieno, copolímero de acrilonitrilo/butadieno/estireno, copolímero de acrilato de vinilacetilo, copolímero de cloruro de vinilo/acrilato, partículas inorgánicas inertes, dióxido de cromo, óxidos de hierro, sílice, mezclas de sílice, materia proteica, o mezclas de los mismos, incluyendo, aunque sin limitación, perlas de sefarosa, perlas de látex, partículas de cubierta-núcleo, y similares. Las micropartículas preferentemente están monodispersadas y pueden ser magnéticas, tales como perlas paramagnéticas. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.628.037, nº 4.965.392, nº 4.695.393, nº 4.698.302 y nº 4.554.088. Las micropartículas pueden utilizarse en una cantidad de entre aproximadamente 1 y 10.000 µg/ml.

La expresión "de interés" se refiere a un analito o sustancia de posible relevancia que debe analizarse o determinarse.

La "detección" incluye cualesquiera medios de detección, incluyendo las detecciones directa e indirecta. El término "detección" se utiliza en el sentido más amplio, incluyendo mediciones tanto cualitativas como cuantitativas de un analito, en la presente memoria mediciones de un analito. En un aspecto, se utiliza un método de detección tal como se indica en la presente memoria, con el fin de identificar la mera presencia de un analito de interés en una muestra. En otro aspecto, el método puede utilizarse para cuantificar una cantidad de analito en una muestra.

La expresión "reducir o inhibir" se refiere a disminuir o reducir una actividad, función y/o cantidad en comparación con una referencia. La expresión "reducir o inhibir" se refiere a la capacidad de causar una reducción global preferentemente de 10% o superior, más preferentemente de 25% o superior, y todavía más preferentemente de 50%, 75%, 90%, 95% o superior.

La expresión "incrementar", por ejemplo "incrementar señales específicas" o "el incremento de las señales de EEQL" se refiere a incrementar o elevar una actividad, función y/o cantidad en comparación con una referencia. La expresión "incrementar o elevar" se refiere a la capacidad de causar un incremento global preferentemente de 10% o superior, más preferentemente de 25% o superior, y todavía más preferentemente de 50% o superior.

El término "determinar" se utiliza en la presente memoria para la detección tanto cualitativa como cuantitativa de un analito y puede incluir la determinación de la cantidad y/o concentración del analito.

El término "medir"/"medición" en ciencia es el procedimiento de estimar o determinar la magnitud de una cantidad, tal como una longitud o masa, respecto a una unidad de medición, tal como un metro o un kilogramo. El acto de medir/la medición utiliza un punto de referencia respecto al que pueden evaluarse otras cosas. El término medición también puede utilizarse para referirse a un resultado específico (valores determinados) obtenido de un procedimiento de medición. Es la base para una comparación. El experto en la materia conocerá materiales y métodos para correlacionar las señales medidas o los valores determinados con las concentraciones.

Una "composición de reactivos" o "composición de reactivos de EQL" según la presente invención comprende reactivos que permiten la generación de señales EQL, por ejemplo un co-reactivo, un agente tamponador para el control del pH, y opcionalmente otros componentes. El experto en la materia conocerá componentes presentes en una composición de reactivos que resultan necesarios para la generación de la señal EQL en métodos de detección electroquimioluminiscentes.

Una "solución acuosa" tal como se utiliza en la presente memoria es una solución homogénea de partículas, sustancias o compuestos líquidos disueltos en agua. Una solución acuosa comprende además solventes orgánicos. Los solventes orgánicos son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo metanol, etanol o dimetilsulfóxido. Tal como se utiliza en la presente memoria también debe entenderse que una solución acuosa puede comprender como máximo 50% de solventes orgánicos.

Una especie que participa en el marcaje EQL en el proceso de EQL se denominan en la presente memoria "co-reactivos" de EQL. Entre los co-reactivos utilizados comúnmente para la EQL se incluyen las aminas terciarias (por ejemplo la tripropilamina (TPA)), el oxalato y el persulfato. El experto en la materia conocerá los co-reactivos disponibles que resultan útiles para los métodos de detección electroquimioluminiscente.

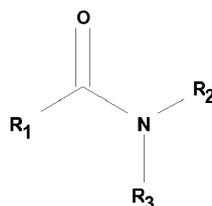
Una "fase sólida", también conocida como "soporte sólido", es material polimérico insoluble funcionalizado al que pueden engancharse o unirse covalentemente elementos de biblioteca o reactivos (con frecuencia mediante un conector) para inmovilizarse o dejar que se separen fácilmente (mediante filtración, centrifugación, lavado, etc.) de los reactivos en exceso, los productos secundarios de reacción solubles, o los solventes. Las fases sólidas para el método según la invención se encuentran ampliamente descritos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Butler J.E., Methods 22:4-23, 2000). La expresión "fase sólida" se refiere a una sustancia no fluida e incluye partículas (incluyendo micropartículas y perlas) preparadas con materiales tales como polímero, metal (partículas ferromagnéticas, paramagnéticas), vidrio y cerámica; sustancias de gel, tales como los geles de sílice, alúmina y polímero; capilares, que pueden prepararse con polímero, metal, vidrio y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas de microtitulación; tiras sólidas; y cubetas, tubos, chips u otros recipientes de muestra para espectrómetro. Un componente de fase sólida de un ensayo se distingue de las superficies sólidas inertes con las que el ensayo puede encontrarse en contacto en que una "fase sólida" contiene por lo menos una fracción sobre su superficie, que está destinado a interactuar con el anticuerpo de captura o molécula de captura. Una fase sólida puede ser un componente estacionario, tal como un tubo, tira, cubeta, chip o placa de microtitulación, o pueden ser componentes no estacionarios, tales como perlas y micropartículas. Las micropartículas también pueden utilizarse como fase sólida para formatos de ensayo homogéneo. Puede utilizarse una diversidad de micropartículas que permiten la unión no covalente o covalente de proteínas y otras sustancias. Entre dichas partículas se incluyen partículas de polímero tales como poliestireno y poli(metilmacrilato); partículas de oro, tales como nanopartículas de oro y coloides de oro, y partículas cerámicas, tales como partículas de sílice, vidrio y de óxido metálico. Ver, por ejemplo, Martin C.R. et al., Analytical Chemistry-News & Features 70:322A-327A, 1998, que se incorpora como referencia en la presente memoria.

Los términos "chip", "biochip", "chip de polímero" o "chip de proteína" se utilizan intercambiamente y se refieren a una colección de un gran número de sondas, marcadores o marcadores bioquímicos dispuestos sobre un sustrato compartido (por ejemplo una fase sólida) que podría ser una parte de una oblea de silicio, una tira de nilón, una tira de plástico o un portaobjetos de vidrio.

#### Métodos:

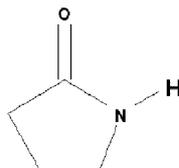
En una realización, la presente invención se refiere a un método para medir un analito en una muestra mediante la detección electroquimioluminiscente, que comprende las etapas de: a) incubar la muestra con un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente, b) separar el reactivo de detección marcado unido a analito y separado del analito, c) incubar el reactivo de detección marcado que se ha separado, con una composición de reactivos que comprende: i) por lo menos un co-reactivo, e ii) por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas del ácido carbónico de fórmulas I y II,

Fórmula I



con  $R_1 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{F}, \text{CH}_2\text{Cl}, \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CHClCH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}, \text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CClHCH}_2\text{CH}_3$  o  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , con  $R_2 = \text{H}$ , y con  $R_3 = \text{H}$ ,

Fórmula II,



d) inducir electroquímicamente la liberación de luminiscencia, y e) determinar la señal de electroquimioluminiscencia (EQL), midiendo de esta manera el analito.

Un aspecto de la invención se refiere a métodos de EQL mejorados basados en las composiciones de reactivos de la presente invención, particularmente los métodos EQL que presentan límites de detección bajos. Las composiciones de reactivos inesperadamente incrementan las señales específicas y reducen las señales de fondo. Más concretamente, los métodos de la invención proporcionan una sensibilidad mejorada a niveles de detección bajos mediante la reducción de la electroquimioluminiscencia de fondo en ausencia de marcajes EQL.

Los inventores inesperadamente han descubierto que la utilización de determinados compuestos del grupo de las amidas del ácido carbónico proporcionan varias ventajas, entre ellas una generación de señales mejoradas en los métodos de detección EQL y, de esta manera, un rendimiento mejorado del ensayo EQL.

Una característica de la invención son métodos para la determinación de un analito en una muestra que debe investigarse utilizando un marcaje electroquimioluminiscente, en el que se utiliza uno de los métodos listados siguientes para medir los fenómenos electroquimioluminiscentes.

Inesperadamente, los métodos que utilizan compuestos seleccionados de entre el grupo de amidas de ácido carbónico emiten menos luminiscencia de fondo que los reactivos de ensayo convencionales sin dichos compuestos. Lo anterior resulta particularmente una ventaja a niveles de detección bajos en los que el incremento de la proporción de señal a fondo (=proporción de señal a ruido) mejora en gran medida la sensibilidad. Inesperadamente, los inventores han encontrado que la realización de una detección electroquimioluminiscente utilizando un método según la presente invención resulta en una proporción mejorada de señal a ruido de 10% a 60% de la detección EQL.

El método para medir un analito en una muestra mediante detección electroquimioluminiscente según la presente invención puede llevarse a cabo en una realización en una solución acuosa.

En una realización, la amida de ácido carbónico utilizada en el método se selecciona de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-fluoroacetamida, 2-cloroacetamida, propanamida, 2-cloropropanamida, 3-cloropropanamida, butanamida y 2-clorobutanamida.

En una realización preferente, la amida de ácido carbónico utilizada en el método se selecciona de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-cloroacetamida, propanamida y butanamida.

En una realización preferente, la amida de ácido carbónico utilizada en el método se selecciona de entre el grupo que consiste de acetamida, propanamida y butanamida.

En una realización preferente, la amida de ácido carbónico se utiliza en el método en una concentración de entre 0,01 M y 0,25 M. En una realización preferente adicional, la amida de ácido carbónico se utiliza a una concentración de entre 0,01 M y 0,2 M. En una realización preferente adicional, la amida de ácido carbónico se utiliza a una concentración de entre 0,01 M y 0,1 M.

En una realización, el método según la presente invención resulta particularmente adecuada para detectar biomoléculas, tales como proteínas, polipéptidos, péptidos, fragmentos peptídicos, hormonas, hormonas peptídicas, vitaminas, provitaminas, metabolitos de vitamina y aminoácidos en una muestra de interés.

5 La muestra utilizada en los métodos según la presente invención es en una realización una muestra líquida, por ejemplo sangre completa, suero o plasma. La muestra, o más específicamente la muestra de interés, en una realización puede comprender cualquier líquido corporal y heces. En una realización, la muestra es una muestra líquida, tal como saliva, extractos de heces, orina, sangre completa, plasma o suero. En una realización, la muestra es de sangre completa, plasma o suero.

10 Es conocido por el experto en la materia que las etapas "a) incubar la muestra con un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente" y "b) separar el reactivo de detección marcado unido a analito y libre de analito" en el método podría llevarse a cabo en el mismo sitio, por ejemplo en el mismo recipiente de reacción. Dichas etapas (a) y (b) podrían llevarse a cabo en un procedimiento automático controlado por medios de control.

15 Los componentes de muestra no específicos y el reactivo de detección marcado libre de analito pueden separarse en la etapa (b) según el método en un procedimiento de separación. Por ejemplo, el reactivo de detección marcado unido a analito y libre de analito pueden separarse utilizando una etapa de lavado.

Además pueden utilizarse otros componentes de ensayo que permitan la detección electroquimioluminiscente en los métodos según la presente invención.

20 Un aspecto de la invención cubre la necesidad de una conservación eficaz, por ejemplo para el almacenamiento a largo plazo de mezclas de reactivos y composiciones de reactivos. Los conservantes adecuados no deberían presentar ningún efecto sobre la generación de señales EQL o en un caso ideal, una influencia positiva sobre la generación de señales EQL.

25 Como compuestos conservantes adecuados se identificaron el ácido bórico y/o borato, que controla eficazmente el crecimiento bacteriano y fúngico e inesperadamente incrementa las señales EQL específicas. Un método de detección EQL con una composición de reactivos que comprende ácido bórico y/o borato como conservante presenta el efecto positivo inesperado de un incremento de la señal EQL específica generada.

30 En una realización, la presente invención se refiere a un método para medir un analito en una muestra mediante la detección electroquimioluminiscente, que comprende las etapas de: a) incubar la muestra con un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente, b) separar el reactivo de detección marcado unido a analito y separado del analito, c) incubar el reactivo de detección marcado que se ha separado, con una composición de reactivos que comprende: i) por lo menos un co-reactivo, e ii) un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato, d) inducir electroquímicamente la liberación de luminiscencia, y e) 35 determinar la señal electroquimioluminiscente (EQL), midiendo de esta manera el analito.

40 En una realización, el método de medición de un analito en una muestra mediante detección electroquimioluminiscente se caracteriza porque la composición de reactivos para la generación de señales EQL comprende un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato a una concentración de entre 0,1% y 5%, preferentemente a concentraciones de entre 0,5% y 4%, y más preferentemente a una concentración de entre 0,5% y 2%.

45 En una realización, el método de medición de un analito en una muestra mediante detección electroquimioluminiscente se caracteriza porque la composición de reactivos para la generación de señales EQL comprende ácido bórico como conservante a concentraciones de entre 0,1% y 5%, preferentemente a concentraciones de entre 0,5% y 4%, y más preferentemente a una concentración de entre 0,5% y 2%.

50 En una realización, el método de medición de un analito en una muestra mediante detección electroquimioluminiscente se caracteriza porque la composición de reactivos para la generación de señales EQL comprende borato como conservante a concentraciones de entre 0,1% y 5%, preferentemente a concentraciones de entre 0,5% y 4%, y más preferentemente a concentraciones de entre 0,5% y 2%.

55 Los inventores han encontrado que un método para medir un analito en una muestra mediante detección electroquimioluminiscente que combina el efecto de las amidas de ácido carbónico y ácido bórico y/o borato en una composición de reactivos puede resultar en una proporción de señal a ruido adicionalmente mejorada en la detección EQL. El efecto acumulado de las amidas de ácido carbónico y ácido bórico y/o borato en una composición de reactivos conduce a una generación de señales mejorada por lo menos al 10%, al 25% o al 50% en la detección EQL.

60 En una realización, la presente invención se refiere a un método para medir un analito en una muestra mediante la detección electroquimioluminiscente, que comprende las etapas de: a) incubar la muestra con un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente, b) separar el reactivo de detección marcado unido a analito y separado de analito, c) incubar el reactivo de detección marcado que se ha separado, con una composición de reactivos que comprende: i) por lo menos un co-reactivo, e ii) por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e iii) por lo menos un conservante seleccionado de 65

entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato, d) inducir electroquímicamente la liberación de luminiscencia, y e) determinar la señal electroquimioluminiscente (EQL), midiendo de esta manera el analito.

5 En una realización, el método para medir un analito en una muestra mediante detección electroquimioluminiscente se caracteriza porque la composición de reactivos comprende además un detergente y un agente tamponador.

En una realización, el método para medir un analito en una muestra mediante detección electroquimioluminiscente se caracteriza porque la composición de reactivos comprende además una sal y/o un agente antiespumante.

10 En una realización, la invención se refiere a un método para llevar a cabo un ensayo electroquimioluminiscente, en el que se induce electroquimioluminiscencia en presencia de una composición de reactivos según la presente invención.

15 Un procedimiento de medición EQL típico para un inmunoensayo EQL comprende múltiples intercambios de líquidos y/o mezclas en la celda de medición EQL (por ejemplo una celda de flujo). Un procedimiento de medición EQL típico consiste de varias etapas explicadas posteriormente.

20 El experto en la materia conocerá que la celda de medición EQL debe acondicionarse o regenerarse antes de que tenga lugar la etapa de detección EQL mediante enjuague de dicha celda de medición EQL con una composición de reactivos según la presente invención y adicionalmente la aplicación de un potencial eléctrico. Dicha etapa es una parte del procedimiento de determinación de analitos utilizando la EQL. Se ha descrito en la patente EP n° 1 051 621 que durante dicha etapa de acondicionamiento se forma una capa sobre la superficie del electrodo o electrodos de medición que permiten la generación de una señal durante la medición de un analito en una celda de medición EQL.

25 Para un procedimiento típico de medición EQL, se induce una mezcla de reactivos en la celda de medición EQL limpia y acondicionada a través del canal de entrada de líquidos en la cavidad de la celda de medición EQL. Dicha mezcla es una incubación de la muestra, reactivos y partículas magnéticas. Dicha mezcla inducida en la celda de medición puede circundarse de una composición de reactivos según la presente invención que fluya delante y después de dicha mezcla.

30 En dicho inmunoensayo EQL, un reactivo de detección que comprende moléculas de complejo que se marcan con un grupo electroquimioluminiscente y que son característicos para el análisis, se une a dichas partículas magnéticas mediante un par de parejas de unión bioquímica específicas, por ejemplo estreptavidina y biotina. Las partículas magnéticas se recubren, por ejemplo, con estreptavidina-polímero, mientras que la biotina se une a las moléculas del complejo.

35 En la celda de medición EQL, las partículas magnéticas resultan atrapadas en la superficie del electrodo conjuntamente con las moléculas de complejo marcadas unidas al mismo en el campo magnético de un imán dispuesto en proximidad a dicho electrodo. Se aplica el campo magnético durante un flujo continuo de la mezcla, de manera que lo incubado y/o la composición de reactivos se descarga de la cavidad de la celda de medición EQL mediante el canal de salida de líquido.

40 Tras atrapar las partículas magnéticas, se induce la entrada de una composición de reactivos según la presente invención que contiene un co-reactivo EQL en la celda de medición EQL en una etapa siguiente, lavando de esta manera las partículas magnéticas con dicha composición de reactivos. Esta etapa de lavado está destinada a eliminar los componentes no unidos de dicho incubado del electrodo que potencialmente interfieren con la reacción electroquímica.

45 A continuación, se induce electroquímicamente la liberación de la señal electroquimioluminiscente (EQL) mediante la aplicación de un potencial eléctrico, de manera que la intensidad de la luz luminiscente se detecta mediante un fotosensor y puede evaluarse como medida de la concentración de las moléculas de complejo marcadas sobre las partículas magnéticas localizadas en la superficie del electrodo, de manera que dicha concentración nuevamente sirve como medida para la concentración del analito en la muestra.

50 Tras la detección electroquimioluminiscente, la celda de medición EQL habitualmente se enjuaga con un líquido de lavado.

55 Un aparato para llevar a cabo los métodos de detección mediante electroquimioluminiscente se menciona en la sección de ejemplos (Ejemplo 1, 2 o 3) o se describe en el documento n° EP 1 892 524 (A1). Además, dicho aparato puede comprender medios para controlar la temperatura de la unidad medidora y/o un recipiente de líquido. La unidad de medición se entiende que es una celda en la que se mide la electroquimioluminiscencia. El recipiente de líquido puede ser un recipiente de almacenamiento, aunque también un dispositivo de alimentación, por ejemplo un tubo para la solución de reactivos, contenida en la unidad de medición durante las mediciones.

60

65

Composiciones:

Un aspecto de la invención se refiere a una composición de reactivos mejorada para la generación de señales EQL, que conduce a proporciones de señal a ruido mejoradas. Más concretamente, la composición de reactivos de la invención proporciona una sensibilidad mejorada a niveles de detección bajos mediante la reducción de la electroquimioluminiscencia de fondo en ausencia de marcajes EQL. Inesperadamente, una composición de reactivos que comprende compuestos como amidas de ácido carbónico emite menos luminiscencia de fondo que los reactivos de ensayo convencionales sin estos compuestos. Lo anterior resulta particularmente una ventaja a niveles de detección bajos en los que el incremento de la proporción de señal a fondo (=proporción de señal a ruido) mejora en gran medida la sensibilidad. Dicha composición de reactivos mejorada contiene un compuesto del grupo de las amidas de ácido carbónico, así como otros compuestos que permiten el método para generar EQL. De manera similar, los inventores han encontrado que la realización de una detección electroquimioluminiscente utilizando una composición de reactivos según la presente invención resulta en una proporción mejorada de señal a ruido de 10% a 60% de detección de EQL.

Un aspecto de la invención se refiere a una composición de reactivos que proporciona proporciones de señal a fondo elevadas en ensayos de electroquimioluminiscencia. Se incrementa la diferencia de señal entre las señales específicas y las señales de fondo. Dichas propiedades mejoradas se han conseguido mediante la identificación de combinaciones ventajosas de co-reactivo de EQL, agentes tamponadores del pH, detergente y pH y, en particular, mediante la utilización de compuestos seleccionados de entre el grupo que consiste de amidas de ácido carbónico.

La composición de reactivos proporciona un medio adecuado para inducir eficientemente que los marcajes EQL emitan EQL y para medir con precisión marcajes EQL mediante la medición de la EQL. La composición de reactivos de la invención puede comprender opcionalmente componentes adicionales, entre ellos conservantes, detergentes, agentes antiespumantes, especies activas EQL, sales, compuestos ácidos y básicos para el control del pH (agentes tamponadores), iones metálicos y/o agentes quelantes de metales. La composición de reactivos de la invención puede incluir además componentes de un ensayo biológico, que en algunos casos pueden marcarse con un marcaje EQL, incluyendo reactivos de unión, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores y/o inhibidores de enzimas. La invención incluye además reactivos de ensayo, composiciones, kits, sistemas y componentes del sistema que comprenden la composición de reactivos de la invención y, opcionalmente, componentes de ensayo adicionales. La invención incluye además métodos para llevar a cabo ensayos EQL utilizando la composición de reactivos de la invención.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo.

En una realización, la amida de ácido carbónico de la composición de reactivos se selecciona de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-fluoroacetamida, 2-cloroacetamida, propanamida, 2-cloropropanamida, 3-cloropropanamida, butanamida y 2-clorobutanamida.

En una realización preferente, la amida de ácido carbónico se selecciona de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-cloroacetamida, propanamida y butanamida. En una realización adicional, la amida de ácido carbónico se selecciona de entre el grupo que consiste de acetamida, propanamida y butanamida. Las amidas de ácido carbónico presentan óptimos individuales de concentración para el efecto potenciador de la EQL. Tal como se muestra en los experimentos (especialmente en las Tablas 2, 3 y 4), el experto en la materia sabrá seleccionar la concentración apropiada para la amida de ácido carbónico seleccionada en la composición de reactivos. Los métodos para determinar la concentración óptima para una amida de ácido carbónico en la composición de reactivos son conocidos por el experto en la materia.

En una realización, la composición de reactivos comprende las amidas de ácido carbónico a una concentración de entre 0,01 M y 0,25 M. En una realización adicional, la composición de reactivos comprende las amidas de ácido carbónico a una concentración de entre 0,01 M y 0,2 M. En una realización adicional, la composición de reactivos comprende las amidas de ácido carbónico a una concentración de entre 0,01 M y 0,1 M.

El co-reactivo de la composición de reactivos en una realización se selecciona de entre el grupo de las aminas terciarias (por ejemplo tripropilamina (TPA)), oxalato y persulfato. En una realización preferente, el co-reactivo es TPA.

Puede resultar beneficioso al almacenar una composición de reactivos incluir un conservante que evite el crecimiento microbiano. Además, se identifican conservantes adecuados para controlar el crecimiento bacteriano y fúngico para permitir el almacenamiento a largo plazo y la utilización de la composición de reactivos. La composición de reactivos según la presente invención puede contener además uno o más conservantes. En una realización de la presente invención, la composición de reactivos comprende un conservante (agente conservante).

En una realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, e iii) por lo menos un conservante.

5 Preferentemente, el conservante presenta un efecto nulo o positivo sobre la generación de señales EQL. Es conocido por el experto en la materia que las oxazolidinas (por ejemplo Oxaban A o 4,4-dimetil-oxazolidina), la azida y los conservantes relacionados son compatibles con la EQL. Las oxazolidinas a concentraciones de entre 0,01% y 1% se utilizan normalmente en los reactivos de ensayo. En una realización, la composición de reactivos comprende conservantes seleccionados de entre el grupo de las oxazolidinas, preferentemente Oxaban A. En una realización, la  
10 composición de reactivos comprende conservantes a una concentración de entre 0,01% y 1%; en otra realización, la composición de reactivos comprende conservantes a una concentración de entre 0,1% y 1%. También puede resultar beneficioso utilizar una mezcla de dos o más conservantes.

15 La amida de ácido carbónico 2-cloroacetamida (CAA), tal como ya se ha mencionado anteriormente, presenta además de su efecto potenciador de la señal EQL, también una función conservante.

Tal como se ha indicado anteriormente, un aspecto de la invención cubre la necesidad de añadir un conservante eficaz que presenta una influencia nula o positiva sobre la generación de señales EQL. Como compuestos inorgánicos adecuados se ha identificado el ácido bórico y/o borato, que controla eficazmente el crecimiento bacteriano y fúngico. Inesperadamente los inventores han encontrado que el ácido bórico y/o borato presente en una  
20 composición de reactivos para determinar la EQL no presenta ninguna influencia negativa sobre la generación de señales EQL. Inesperadamente se ha encontrado que una composición de reactivos que comprende ácido bórico o borato como conservante presenta un efecto positivo sobre el proceso de generación de señales EQL, es decir, un incremento de la señal específica. Además, su actividad elevada y bajo grado de problemas asociados a riesgos de seguridad o problemas medioambientales resultan ventajosos. El ácido bórico o borato, al contrario que algunos  
25 otros conservantes utilizados comúnmente en composiciones de reactivos, se encuentra libre de halógenos y no libera formaldehído. Los resultados presentados por el ácido bórico en la generación de señales EQL se muestran en la sección de ejemplos, por ejemplo en el Ejemplo 2.

30 En una realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) por lo menos un co-reactivo, e ii) por lo menos un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato.

35 En una realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) por lo menos un co-reactivo, e ii) el conservante ácido bórico.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) por lo menos un co-reactivo, e ii) el conservante borato.

40 En una realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, e iii) por lo menos un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato.

45 En una realización, la composición de reactivos según la presente invención comprende ácido bórico o borato como conservante a una concentración de entre 0,1% y 5%, preferentemente a una concentración de entre 0,5% y 4%, y resulta particularmente preferente una concentración de entre 0,5% y 2%.

50 En una realización preferente, la composición de reactivos según la presente invención comprende ácido bórico como conservante a concentraciones de entre 0,1% y 5%, preferentemente a una concentración de entre 0,5% y 4%, y resulta particularmente preferente una concentración de entre 0,5% y 2%.

55 En una realización preferente, la composición de reactivos según la presente invención comprende borato como conservante a concentraciones de entre 0,1% y 5%, preferentemente a una concentración de entre 0,5% y 4%, y resulta particularmente preferente una concentración de entre 0,5% y 2%.

60 La composición de reactivos según la presente invención comprende opcionalmente además otros componentes de ensayo. Otros componentes de ensayo se seleccionan de entre el grupo que consiste de por lo menos un detergente, por lo menos un compuesto potenciador de la señal, agentes tamponadores que comprenden agentes ácidos y básicos para el control del pH, y agua.

65 En una realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, e iii) por lo menos un conservante, iv) agentes tamponadores, v) por lo menos un detergente, vi) una sal y/o agente antiespumante, y vii) opcionalmente otros componentes de ensayo.

Los detergentes adecuados para una composición de reactivos según la presente invención son aquellos pertenecientes al grupo que consiste de etoxilatos de alcohol de ácido graso, incluyendo éteres de poli(etilenglicol), por ejemplo polidocanol u otros éteres de poli(etilenglicol) de fórmula  $C_xEO_y$ , en la que  $x=8-18$  e  $Y=2-9$ , genapol (isotridecildipoli(éter de etilenglicol)<sub>n</sub>), Plantaren® (alquilpoliglucósido), octilglucósido (octil-beta-D-glucopiranósido), así como detergentes zwitteriónicos como Zwittergent 3-12 o una mezcla de los mismos. Los detergentes se utilizan a concentraciones de entre 0,01% y 2%. La concentración óptima puede determinarse fácilmente para cada detergente. Las concentraciones más adecuadas son las comprendidas en el intervalo de entre 0,05% y 1%.

En una realización, la composición de reactivos según la presente invención comprende detergentes seleccionados de entre el grupo que consiste de polidocanol u otros éteres de poli(etilenglicol) de fórmula  $C_xEO_y$ , en la que  $x=8-18$  e  $Y=2-9$ , octilglucósido (octil-beta-D-glucopiranósido) o detergentes zwitteriónicos como Zwittergent 3-12 o una mezcla de los mismos. En una realización preferente, la composición de reactivos comprende detergentes seleccionados de entre el grupo que consiste de polidocanol, octilglucósido (octil-beta-D-glucopiranósido) y Zwittergent 3-12, o una mezcla de los mismos.

Además, la señal electroquimioluminiscente también puede incrementarse mediante el ajuste del pH a un valor de entre 6,0 y 8,0, preferentemente de entre 6,0 y 7,5, resulta particularmente preferente un valor de entre 6,2 y 6,9. Lo anterior puede llevarse a cabo convencionalmente mediante la utilización de un agente tamponador del pH adecuado para dicho intervalo, conocido por el experto en la materia. En una realización, el agente tamponador adecuado para la composición de reactivos comprende KOH y ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ).

Además, la señal puede incrementarse mediante la adición de sales, incluyendo sales inorgánicas como, por ejemplo, NaBr, NaCl y NaI. Las sales, especialmente NaCl, se añaden a concentraciones de entre 1 mM y 1 M, preferentemente de entre 10 mM y 100 mM y más preferentemente de entre 10 mM y 50 mM.

Puede resultar beneficioso, especialmente en aplicaciones de HTS (por sus siglas en inglés, cribado de alto rendimiento), para evitar la producción de burbujas o espuma. Por ello, puede resultar deseable añadir agentes antiespumantes a la composición de reactivos. Muchos agentes antiespumantes comerciales (incluyendo Antifoams o-30, Antifoam 204, Antifoam A, Antifoam SE-15, Antifoam SO-25 y Antifoam 289) pueden añadirse a la composición de reactivos según la presente invención.

La composición de reactivos de la invención puede incluir marcajes EQL. Los marcajes EQL pueden ser marcajes EQL convencionales. Entre los ejemplos de marcajes EQL se incluyen compuestos tris-bipiridil-rutenio (RuBpy) y otros compuestos organometálicos, en los que el metal es de, por ejemplo, los metales de los grupos VII y VIII, incluyendo Re, Ru, Ir y Os. Estos marcajes EQL son utilizados por el experto en la materia para marcar un reactivo específico de analito con un grupo electroquimioluminiscente o para marcar el analito mismo con un grupo electroquimioluminiscente. En una realización, la composición de reactivos de la invención contiene un analito marcado y/o un reactivo específico de analito marcado, en el que el marcaje EQL se selecciona de entre el grupo que consiste de los marcajes EQL dados a conocer en la patente US nº 5.310.687 (A) (BPRu=Ru(bpy)<sub>2</sub>-bpyCO-OSu), documento nº US 2003/0124572 (A1) (éster de NHS de sulfo-BPRu), documento nº EP720614(A1) (Bpy<sub>2</sub>-Ru-bpy-CO-UEEK-korks.-OSu) y documento nº WO 2002/027317 (A2) (BPRu-(UE)-25-K y BPRu2SK<sub>4</sub>), respectivamente.

Los reactivos y mezclas de los mismos utilizados en la composición de reactivos pueden proporcionar en forma líquida, congelada, ultracongelada, sublimada inversamente, liofilizada, gaseosa, sólida o seca antes de la utilización. Por lo menos antes de la utilización de la composición de reactivos, estos se disuelven en un solvente. Las composiciones de reactivos de la presente invención se encuentran en una solución acuosa. En una realización preferente, los reactivos se disuelven en agua.

Estas formulaciones mejoradas resultan de particular valor en los ensayos de alta sensibilidad. En algunas realizaciones de la invención, se mejora el rendimiento de los ensayos EQL adicionalmente mediante combinaciones óptimas de la composición de reactivos con la composición de electrodo. Dichas composiciones de electrodo EQL adecuadas comprenden electrodos de Ir, Pt o carbono.

Estas combinaciones ventajosas, incluyendo las amidas de ácido carbónico potenciadoras de la EQL anteriormente indicadas y conservantes adecuados seleccionados de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato, los cuales presentan ambas propiedades mejoradas. Entre ellas se incluyen un rango dinámico más elevado y una proporción mejorada de señal EQL del marcaje unido a señal EQL de fondo, utilizando la composición de reactivos dada a conocer según la presente invención. Esta sensibilidad incrementada resulta importante, por ejemplo, en ensayos que se benefician de un límite de detección más bajo (por ejemplo el ensayo de troponina T (TNThs, nº de catálogo 05092744), ensayo de antígeno de cubierta del virus de la hepatitis B (HBeAg, nº de catálogo 11820583), ensayo anti-receptor de tirotrina (anti-TSHR; nº de catálogo 04388780); para más información ver la sección de Ejemplos).

Dichas formulaciones mejoradas de composiciones de reactivos pueden proporcionar una mejor precisión que puede resultar en un límite de detección más bajo en los ensayos EQL.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a una reducción de los costes debido a una reducción de los volúmenes requeridos de muestra, reactivos específicos de ensayo y/o reactivo de ensayo. La pérdida de señal con volúmenes de reactivo más bajos puede compensarse mediante la utilización de la composición de reactivos ventajosa según la presente invención.

10 Todavía otro aspecto de la invención se refiere a sistemas y aparatos mejorados que contienen la composición de reactivos de la invención y/o sistemas y aparatos mejorados adaptados para llevar a cabo los métodos mejorados de la invención.

15 La generación de señales EQL también puede mejorarse utilizando los resultados anteriormente indicados solos o en combinación entre sí.

#### Mezcla de reactivos:

20 Para la determinación de la EQL, la composición de reactivos según la presente invención puede mezclarse con compuestos adicionales que forman una mezcla de reactivos. En una realización, la presente invención se refiere a una mezcla de reactivos para determinar la EQL, que comprende una composición de reactivos para determinar la ELC, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, una muestra que debe investigarse y iv) por lo menos un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente.

25 En una realización, la presente invención se refiere a una mezcla de reactivos para determinar la EQL, que comprende una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, iii) por lo menos un conservante, iv) una muestra que debe investigarse y v) por lo menos un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente.

30 En una realización, la presente invención se refiere a una mezcla de reactivos para determinar la EQL, que comprende una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, iii) un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato, iv) una muestra que debe investigarse y v) por lo menos un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente.

35 En una realización adicional, la presente invención se refiere a una mezcla de reactivos para determinar la EQL, que comprende una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato, ii) por lo menos un co-reactivo, iii) una muestra que debe investigarse y iv) por lo menos un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente. En una realización preferente, la mezcla de reactivos comprende el conservante ácido bórico. En una realización preferente, la mezcla de reactivos comprende el conservante borato.

40 La presente invención se refiere también en una realización a una mezcla de reactivos para determinar la EQL, que comprende una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato, ii) por lo menos un co-reactivo, iii) una muestra que debe investigarse y iv) un detergente, v) un agente tamponador, vi) por lo menos un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente, y vii) que comprende una sal y/o un agente antiespumante.

45 En una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a una mezcla de reactivos para determinar la EQL, que comprende una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, iii) un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato, iv) una muestra que debe investigarse, v) un detergente, vi) un agente tamponador, y vii) por lo menos un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente.

50 La mezcla de reactivos además puede comprender por lo menos un detergente y un agente tamponador para el control del pH. Opcionalmente la mezcla de reactivos puede comprender una sal y/o un agente antiespumante.

60 Otros componentes de ensayo en la mezcla de reactivos se seleccionan de entre el grupo que consiste de reactivos específicos de analito no marcados, homólogos de analito, recubrimientos de fase sólida y sustancias que reducen la interferencia.

Utilización:

Un aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de una composición de reactivos mejorada y/o una mezcla de reactivos mejorada de la invención para llevar a cabo un método de detección electroquimioluminiscente.

5 En una realización, la invención se refiere a la utilización de una amida de ácido carbónico seleccionada de entre el grupo de fórmulas I y II para llevar a cabo una detección electroquimioluminiscente. En una realización, la presente invención se refiere a la utilización de una amida de ácido carbónico seleccionada de entre el grupo de fórmulas I y II para llevar a cabo un procedimiento de un método de detección electroquimioluminiscente.

10 En una realización preferente, la invención se refiere a la utilización de amidas de ácido carbónico seleccionadas de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-fluoroacetamida, 2-cloroacetamida, propanamida, 2-cloropropanamida, 3-cloropropanamida, butanamida y 2-clorobutanamida, para llevar a cabo una detección electroquimioluminiscente.

15 En otra realización preferente, la invención se refiere a la utilización de una amida de ácido carbónico seleccionada de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-cloroacetamida, propanamida y butanamida para llevar a cabo una detección electroquimioluminiscente. En otra realización, la invención se refiere a la utilización de una amida de ácido carbónico seleccionada de entre el grupo que consiste de acetamida, propanamida y butanamida para llevar a cabo una detección electroquimioluminiscente.

20 En una realización, la presente invención se refiere a la utilización de una composición de reactivos que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, e iii) por lo menos un conservante para la determinación de la EQL.

25 En una realización, la presente invención se refiere a la utilización de una composición de reactivos que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, e iii) un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato para la determinación de la EQL.

30 En una realización, la presente invención se refiere a la utilización de una composición de reactivos que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de amidas de ácido carbónico seleccionado de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-fluoroacetamida, 2-cloroacetamida, propanamida, 2-cloropropanamida, 3-cloropropanamida, butanamida y 2-clorobutanamida, ii) por lo menos un co-reactivo, e iii) un conservante para la determinación de la EQL.

35 La composición de reactivos según la presente invención resulta, en una realización, apropiada para el acondicionamiento o regeneración de una celda de medición de EQL y para determinar una señal de EQL. En una realización, dicha composición de reactivos se utiliza como solución de acondicionamiento. En una realización, la composición de reactivos según la presente invención se utiliza para el acondicionamiento o regeneración de una celda de medición de EQL. En una realización, dicha composición de reactivos que comprende un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico seleccionadas de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-fluoroacetamida, 2-cloroacetamida, propanamida, 2-cloropropanamida, 3-cloropropanamida, butanamida y 2-clorobutanamida, se utiliza para el acondicionamiento o la regeneración de celdas de medición de EQL. En otra realización, dicha composición de reactivos que comprende un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico seleccionadas de entre el grupo que consiste de acetamida, propanamida y butanamida se utiliza para el acondicionamiento o la regeneración de celdas de medición de EQL.

50 Para la utilización en la realización de un método de detección electroquimioluminiscente, la composición de reactivos puede mezclarse con compuestos adicionales, por ejemplo una muestra que debe investigarse, por lo menos un reactivo de detección con un grupo electroquimioluminiscente, así como otros componentes indicados posteriormente que permiten el método de formación de una mezcla de reactivos.

55 En una realización, la presente invención se refiere a la utilización de una mezcla de reactivos que comprende una composición de reactivos, a) que comprende i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, e iii) un conservante, b) una muestra que debe investigarse, y c) por lo menos un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente en la determinación de la EQL.

60 La presente invención se refiere a la utilización de una mezcla de reactivos que comprende una composición de reactivos para determinar la EQL, a) que comprende i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, ii) por lo menos un co-reactivo, e iii) un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato, b) una muestra que debe investigarse, y c) por lo menos un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente en la determinación de la EQL.

En una realización adicional, la invención se refiere a la utilización de ácido bórico o borato para la realización de una detección electroquimioluminiscente. Además, en una realización, la presente invención se refiere a la utilización de un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato para llevar a cabo un procedimiento de un método de detección electroquimioluminiscente.

En una realización, la presente invención se refiere a la utilización de una mezcla de reactivos que comprende a) una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende i) un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato, e ii) por lo menos un co-reactivo, b) una muestra que debe investigarse y c) por lo menos un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente en la determinación de la EQL.

Además, la mezcla de reactivos utilizada para determinar la EQL puede comprender componentes seleccionados de entre el grupo que consiste de un detergente y un agente tamponador para el control del pH. Opcionalmente la mezcla de reactivos utilizada puede comprender una sal y/o un agente antiespumante. Otros componentes de ensayo en la mezcla de reactivos se seleccionan de entre el grupo que consiste de reactivos específicos de analito no marcados, homólogos de analito, recubrimientos de fase sólida y sustancias que reducen la interferencia.

#### Kit:

Un aspecto de la invención se refiere a kits que comprenden, en uno o más recipientes, uno o más componentes de la composición de reactivos de la invención. Estos componentes pueden combinarse, opcionalmente con reactivos adicionales, para formar la composición de reactivos de la invención. Los kits pueden comprender además, en una realización, componentes adicionales relacionados con el ensayo, tales como marcapos EQL, reactivos de ensayo marcados de EQL, diluyentes, soluciones de lavado, reactivos desnaturalizantes de proteínas, enzimas, reactivos de unión, placas de ensayo, desechables, etc.

En una realización, la composición de reactivos se encuentra contenida en uno o más recipientes de vidrio o plástico, marcados apropiadamente con información sobre el contenido de la composición de reactivos e instrucciones sobre el almacenamiento y utilización apropiados. La información sobre el contenido de la composición de reactivos, número de lote, fecha de producción, fecha de caducidad, instrucciones sobre el almacenamiento y utilización apropiados, también pueden almacenarse en un chip IDRF sobre el recipiente de vidrio o plástico. La información almacenada en dicho chip IDRF puede leerse con una antena conectada a un dispositivo lector de IDRF y procesarse adicionalmente en medios de control.

En una realización, algunos o la totalidad de los componentes de la composición de reactivos pueden almacenarse, en una realización, en un estado líquido o seco.

En una realización, la presente invención se refiere a un kit para medir la EQL, que contiene una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un kit para medir la EQL, que contiene una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) una amida de ácido carbónico seleccionada de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-fluoroacetamida, 2-cloroacetamida, propanamida, 2-cloropropanamida, 3-cloropropanamida, butanamida y 2-clorobutanamida, e ii) por lo menos un co-reactivo.

En otra realización preferente, la presente invención se refiere a un kit para medir la EQL, que contiene una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) una amida de ácido carbónico seleccionada de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-cloroacetamida, propanamida y butanamida, e ii) por lo menos un co-reactivo.

En una realización, la presente invención se refiere a un kit para medir la EQL, que contiene una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, y iii) un conservante.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un kit para medir la EQL, que contiene una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, e ii) por lo menos un co-reactivo, y iii) un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato.

En otra realización preferente, la presente invención se refiere a un kit para medir la EQL, que contiene una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) una amida de ácido carbónico seleccionada de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-fluoroacetamida, 2-cloroacetamida, propanamida, 2-cloropropanamida, 3-cloropropanamida, butanamida y 2-clorobutanamida, ii) por lo menos un co-reactivo, e iii) un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato.

En otra realización preferente, la presente invención se refiere a un kit para medir la EQL, que contiene una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende: i) una amida de ácido carbónico seleccionada de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-cloroacetamida, propanamida y butanamida, ii) por lo menos un co-reactivo, e iii) un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato.

5 En una realización, la presente invención se refiere a un kit para medir la EQL, que contiene una composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende por lo menos i) un conservante seleccionado de ácido bórico y borato e ii) por lo menos un co-reactivo.

10 Las medidas anteriormente indicadas *per se* ya mejoran significativamente los procedimientos conocidos. Además, resulta posible además incrementar significativamente la sensibilidad y/o el rango de medición dinámico de un ensayo de detección de analito mediante la combinación de dichas mediciones.

15 Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

#### Descripción de las figuras

20 Mediciones de EQL utilizando tampones de ensayo (composiciones de reactivos) con amidas de ácido carbónico

Figura 1 Resultados de medición con concentraciones de propanamida de entre 0,001 M y 0,25 M (eje X); tasa de recuperación relativa (% de la referencia) de la medición de  $\Delta$ Ensayo artificial (ensayo artificial-fondo de tampón de ensayo); se muestra el fondo del tampón de ensayo y el ensayo del marcaje libre (eje Y). Ver el Ejemplo 1 para más información.

Figura 2 Resultados de medición con concentraciones de 2-cloroacetamida de entre 0,001 M y 1 M (eje X); tasa de recuperación relativa (% de la referencia) de la medición de  $\Delta$ Ensayo artificial (ensayo artificial-fondo de tampón de ensayo); se muestra el fondo del tampón de ensayo y el ensayo del marcaje libre (eje Y). Ver el Ejemplo 1 para más información.

Figura 3 Resultados de medición con concentraciones de butanamida de entre 0,001 M y 1 M (eje X); tasa de recuperación relativa (% de la referencia) de la medición de  $\Delta$ Ensayo artificial (ensayo artificial-fondo de tampón de ensayo); se muestra el fondo del tampón de ensayo y el ensayo del marcaje libre (eje Y). Ver el Ejemplo 1 para más información.

Figura 4 Resultados de medición con concentraciones de acetamida de entre 0,001 M y 1 M (eje X); tasa de recuperación relativa (% de la referencia) de la medición de  $\Delta$ Ensayo artificial (ensayo artificial-fondo de tampón de ensayo); se muestra el fondo del tampón de ensayo y el ensayo del marcaje libre (eje Y). Ver el Ejemplo 1 para más información.

Figura 5 Resultados de las mediciones con concentraciones de ácido bórico de entre 0% y 5% (eje X); se utilizó el ensayo artificial como ejemplo para una señal específica elevada; el calibrador 1 de HET (hormona estimuladora del tiroides) como calibrador de nivel bajo proporciona una señal de fondo (HET Cal 1); el calibrador 2 de HET proporciona una señal a un nivel de detección elevado (HET Cal 2). Los resultados se representan como % de la composición de reactivos de referencia sin adición de ácido bórico. Ver el Ejemplo 2 para más información.

Se llevaron a cabo mediciones de EQL utilizando el dispositivo Roche Elecsys® 2010 utilizando protocolos disponibles para los ensayos indicados posteriormente.

25 Se añadieron diversas concentraciones de compuestos seleccionados de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico tal como se indica en las Tablas 2, 3 y 4, al tampón de ensayo siguiente:

Tripropilamina (TPA) 180 mM

30 polidocanol al 0,1%

tampón fosfato 300 mM

Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 6,8 utilizando KOH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. También se utilizó el tampón de ensayo como valor del blanco.

35 Los compuestos seleccionados de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico (las fórmulas químicas de las amidas de ácido carbónico se muestran en la Tabla 1) se añadieron al tampón de ensayo (composición de reactivos) a las concentraciones indicadas. Se informan los resultados como recuperación de señal respecto a las mediciones con un tampón de ensayo que no presenta dichos compuestos.

40 Se llevaron a cabo mediciones del tampón de ensayo de fondo con un tampón de ensayo que contenía las amidas de ácido carbónico a la concentración mostrada en la Tabla 2. Los valores inferiores a 100% indican una señal de fondo de EQL reducida mediante la adición de la amida de ácido carbónico seleccionada a las concentraciones indicadas. La reducción de la electroquimioluminiscencia de fondo en ausencia de marcajes EQL resulta

particularmente una ventaja a niveles de detección bajos, en los que el incremento de la proporción de señal a fondo (=proporción de señal a ruido) mejora en gran medida la sensibilidad del ensayo.

Tabla 2:

Concentración	Fondo de tampón de ensayo				
	0,25 M	0,1 M	0,01 M	0,001 M	0,0001 M
2,2 dicloro-acetamida	30%	40%	70%	84%	93%
2-cloroacetamida	66%	69%	80%	94%	98%
2-clorobutanamida	91%	79%	80%	92%	98%
2-clor-N-hidroximetilacetamida	0%	46%	97%	91%	97%
2-clor-N,N-dimetilacetamida	64%	75%	92%	99%	98%
2-clor-N-metoxi-N-metilacetamida	0%	0%	88%	99%	102%
2-cloropropanamida	70%	68%	78%	93%	97%
3-cloropropanamida	n.d.	n.d.	79%	91%	96%
Acetamida	79%	80%	90%	95%	97%
Acetoacetamida	n.d.	55%	85%	94%	98%
2-bromoacetamida	n.d.	n.d.	39%	72%	93%
Butanamida	68%	68%	81%	108%	108%
Formamida	74%	75%	81%	94%	98%
2-fluoroacetamida	73%	77%	91%	101%	102%
2-hidroxi-acetamida	93%	90%	96%	100%	101%
Hexanamida	56%	53%	67%	83%	90%
2-yodoacetamida	0%	0%	0%	0%	34%
Propanodiamida	79%	84%	92%	91%	99%
N-metilpropanamida	88%	90%	94%	98%	100%
2,2 dimetilpropanamida	69%	68%	88%	98%	99%
propanamida (propionamida)	77%	74%	86%	95%	88%
2-pirrolidona	88%	84%	96%	101%	100%
2,5-butanamida	135%	103%	105%	103%	98%
2,2,2-trifluoro-acetamida	98%	85%	87%	95%	99%
Pentanamida	75%	63%	73%	91%	97%
n.d.=no determinado					

5

En un experimento análogo se determinaron las señales del marcaje libre. El valor del marcaje libre representa la señal generada por una solución que contiene un marcaje EQL libre en ausencia de micropartículas (RuBpy 10 nM en el tampón de ensayo). Se indica dicho valor en la Tabla 3 respecto al tampón de ensayo sin ningún compuesto adicional, en %. Este formato de ensayo también es conocido como medición homogénea o formato de ensayo homogéneo. Los valores superiores a 100% indican una señal EQL incrementada mediante la adición de la amida de ácido carbónico seleccionada a la concentración indicada. Se muestran los resultados en la Tabla 3.

10

Tabla 3:

Concentración	Ensayo de marcaje libre				
	0,25 M	0,1 M	0,01 M	0,001 M	0,0001 M
2,2 dicloro-acetamida	33%	66%	145%	120%	104%
2-cloroacetamida	155%	151%	131%	109%	101%
2-clorobutanamida	157%	147%	126%	108%	100%
2-clor-N-hidroximetilacetamida	0%	6%	103%	125%	99%
2-clor-N,N-dimetilacetamida	125%	116%	103%	100%	100%
2-clor-N-metoxi-N-metilacetamida	2%	5%	124%	0%	0%
2-cloropropanamida	113%	155%	132%	110%	102%
3-cloropropanamida	n.d.	n.d.	132%	107%	100%
acetamida	141%	132%	110%	102%	100%
acetoacetamida	6%	21%	130%	104%	97%
2-bromoacetamida	n.d.	n.d.	89%	139%	110%
butanamida	145%	136%	114%	103%	99%
formamida	134%	145%	127%	111%	103%
2-fluoroacetamida	144%	134%	111%	102%	100%
2-hidroxi-acetamida	130%	137%	109%	101%	99%
hexanamida	118%	105,7%	120%	111%	103%
2-yodoacetamida	0%	0%	2%	3%	127%
propanodiamida	123%	135%	115%	115%	100%

N-metilpropanamida	106%	99%	97%	98%	98%
2,2 dimetilpropanamida	125%	120%	106%	99%	97%
propanamida (propionamida)	144%	135%	113%	101%	99%
2-pirrolidona	142%	130%	107%	100%	99%
2,5-butanimida	102%	136%	107%	100%	99%
2,2,2-trifluoro-acetamida	130%	150%	116%	103%	100%
pentanamida	151%	140%	122%	108%	103%
n.d.=no determinado					

Además, se determinaron los valores utilizando el ensayo simplificado que incluía perlas. Este ensayo artificial es un ensayo que incluye micropartículas marcadas con RuBpy para una señal específica elevada. Este formato de ensayo también es conocido como medición heterogénea o formato de ensayo heterogéneo. La diferencia entre la señal de ensayo artificial específica y la señal de fondo (fondo de tampón de ensayo) utilizando el tampón de ensayo tal como se ha indicado anteriormente con los compuestos adicionales indicados como  $\Delta$ Ensayo artificial, en % respecto a tampón de ensayo sin ningún compuesto adicional. Los valores superiores a 100% indican una señal EQL incrementada mediante la adición de la amida de ácido carbónico seleccionada a la concentración indicada. Se muestran los resultados en la Tabla 4.

Tabla 4:

Concentración	$\Delta$ Ensayo artificial= (ensayo artificial-fondo de tampón de ensayo)				
	0,25 M	0,1 M	0,01 M	0,001 M	0,0001 M
2,2 dicloro-acetamida	73%	67%	92%	122%	109%
2-cloroacetamida	160%	165%	148%	113%	104%
2-clorobutanamida	119%	152%	149%	119%	102%
2-clor-N-hidroximetilacetamida	100%	54%	109%	121%	107%
2-clor-N,N-dimetilacetamida	97%	115%	113%	103%	104%
2-clor-N-metoxi-N-metilacetamida	100%	100%	108%	100%	95%
2-cloropropanamida	63%	109%	145%	119%	104%
3-cloropropanamida	n.d.	n.d.	148%	111%	104%
acetamida	138%	144%	123%	110%	106%
acetoacetamida	n.d.	61%	125%	107%	98%
2-bromoacetamida	n.d.	n.d.	68%	129%	114%
butanamida	159%	161%	131%	95%	91%
formamida	51%	76%	116%	110%	105%
2-fluoroacetamida	148%	148%	118%	100%	97%
2-hidroxi-acetamida	32%	85%	108%	100%	99%
hexanamida	52%	59%	81%	113%	109%
2-yodoacetamida	0%	0%	0%	0%	125%
propanodiamida	50%	84%	112%	108%	100%
N-metilpropanamida	104%	106%	104%	102%	100%
2,2 dimetilpropanamida	147%	149%	119%	103%	99%
propanamida (propionamida)	157%	163%	133%	111%	116%
2-pirrolidona	117%	144%	116%	100%	99%
2,5-butanimida	-11%	84%	101%	98%	103%
2,2,2-trifluoro-acetamida	47%	130%	133%	106%	100%
pentanamida	129%	147%	136%	119%	107%
n.d.=no determinado					

En la figura 1 se presenta un gráfico que contiene los resultados para la propanamida, tal como se muestran en las Tablas 2, 3 y 4. En la figura 2 se presenta un gráfico que contiene los resultados para la 2-cloroacetamida, tal como se muestran en las Tablas 2, 3 y 4. En la figura 3 se presenta un gráfico que contiene los resultados para la butanamida, tal como se muestran en las Tablas 2, 3 y 4. En la figura 4 se presenta un gráfico que contiene los resultados para la acetamida, tal como se muestran en las Tablas 2, 3 y 4.

### Ejemplo 2

#### Ácido bórico como conservante potenciador de la señal

Se llevaron a cabo mediciones de EQL utilizando el dispositivo Roche Elecsys® 2010 utilizando los protocolos recomendados para los ensayos indicados posteriormente.

Se utilizó el tampón de ensayo de EQL siguiente para determinar el valor del blanco:

Tripropilamina (TPA) 180 mM  
 Polidocanol al 0,1%  
 Oxaban A al 0,1%  
 Tampón de fosfato 300 mM

A dicho tampón de ensayo se añadieron cantidades crecientes de ácido bórico, tal como se indica. Se ajustó el pH final a 6,8 utilizando KOH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Se llevaron a cabo mediciones del tampón de ensayo de fondo con un tampón de ensayo que contenía ácido bórico a las concentraciones mostradas en la Tabla 5. El valor del marcaje libre representa la señal generada por una solución que contiene un marcaje EQL libre en ausencia de micropartículas (RuBpy 10 nM en el tampón de ensayo, medición homogénea) respecto al tampón de ensayo sin ningún compuesto adicional, en %. El ensayo artificial es un ensayo que incluye micropartículas marcadas con RuBpy para una señal específica elevada. Como ensayo diagnóstico in vitro comercial, se utilizó el ensayo de HET Elecsys® (ensayo de tirotopina para Elecsys®, nº de catálogo 11731459) para determinar la ΔHET. Se utilizó el calibrado 1 de HET (HET juego de cal., nº de catálogo 04738551) como calibrador de niveles bajos (no hay analito presente) en el ensayo de HET, proporcionando una señal de fondo (HET cal. 1); el calibrador 2 de HET se utilizó en el ensayo de HET para proporcionar un valor de señal elevada (HET cal. 2).

Los resultados del ensayo artificial, HET cal. 1 y HET cal. 2 se representan gráficamente en la figura 5 como recuperación relativa en % del tampón de ensayo de referencia sin adición de ácido bórico.

En particular, se llevaron a cabo las mediciones siguientes:

Tabla 5:  
 Recuperación relativa (% de la referencia) - Comparación con un tampón de ensayo sin ácido bórico

Conc. de ácido bórico	0%	0,1%	0,5%	1,0%	2,0%	5,0%
Fondo de tampón de ensayo	100%	103%	102%	98%	103%	103%
Ensayo de marcaje libre	100%	100%	99%	97%	93%	93%
Ensayo artificial	100%	104%	108%	107%	108%	108%
HET Cal. 2	100%	105%	108%	108%	109%	112%
HET Cal. 1	100%	100%	98%	95%	98%	94%

La adición de ácido bórico como conservante en un tampón de ensayo mejora la señal heterogénea específica, especialmente en el ensayo artificial y en la determinación del HET Cal. 2.

Efecto de los tampones de ensayo que contienen propanamida y ácido bórico en el límite de detección inferior de los ensayos Elecsys®

Se determinó el límite de detección inferior con varios ensayos diagnósticos in vitro comerciales (HBeAg: nº de catálogo de Roche: 11820582; Anti-RHET: nº de catálogo de Roche: 04388780, TNThs: nº de catálogo de Roche: 05092744) con el fin de comparar dos preparaciones de tampón de ensayo.

Tampón de ensayo A:

TPA 180 mM, polidocanol al 0,1%, tampón fosfato 300 mM, Oxaban A al 0,1%.

Tampón de ensayo B:

TPA 180 mM, polidocanol al 0,1%, propanamida 50 mM, tampón fosfato 300 mM, ácido bórico al 1%.

Se ajustó el pH final de ambos tampones de ensayo, A y B, a 6,8 utilizando KOH/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Los tres ensayos disponibles comercialmente que se han indicado anteriormente se analizaron para mostrar el efecto del ácido carbónico, amida, propanamida y el conservante ácido bórico sobre el rendimiento de ensayo en la detección de concentraciones de analito muy bajas.

Los ensayos se midieron en un analizador Roche Elecsys® y se calibraron tal como se indica en las instrucciones en el envase. Para calcular el límite de detección inferior, se determinaron las señales de una muestra sin analito (HBeAg, anti-RHET) o con una concentración de analito muy baja (TNThs). Se calculó la desviación estándar de la determinación 21, se multiplicó por 2 (2SD) o 3 (3SD) y se añadió (HBeAg, TNThs) o restó (anti-RHET, ensayo competitivo) de la media de la señal. A continuación, se determinó la concentración correspondiente de las señales

calculadas, utilizando la curva de calibración para cada ensayo. Para muestras con una concentración de analito baja (TNThs), se restó la concentración de analito de la muestra de dichas concentraciones calculadas.

5 Los tres ensayos se beneficiaron de la composición de reactivos mejorada que contenía una amida de ácido carbónico según la presente invención, así como las que contenían ácido bórico, que también presenta una función conservante. Los resultados para los ensayos de HBeAg, anti-RHET y TNThs se muestran en las Tablas 6, 7 y 8, respectivamente.

Tabla 6:

	Límite inferior de detección [u/ml]	
	2 SD	3 SD
HBeAg	2 SD	3 SD
Tampón de ensayo A	0,0030	0,0044
Tampón de ensayo B	0,0018	0,0030

10

Tabla 7:

	Límite inferior de detección [u/ml]	
	2 SD	3 SD
anti-RHET	2 SD	3 SD
Tampón de ensayo A	0,324	0,500
Tampón de ensayo B	0,218	0,332

Tabla 8:

	Límite inferior de detección [pg/ml]	
	(2SD) -Conc. de la muestra	(3SD) -Conc. de la muestra
TNThs	(2SD) -Conc. de la muestra	(3SD) -Conc. de la muestra
Tampón de ensayo A	1,193	1,832
Tampón de ensayo B	0,782	1,140

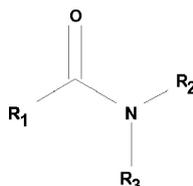
15

## REIVINDICACIONES

1. Método para medir un analito en una muestra mediante detección electroquimioluminiscente, que comprende las etapas de:

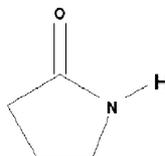
- a) incubar la muestra con un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente,
- b) separar el reactivo de detección marcado unido a analito y no unido a analito,
- c) incubar el reactivo de detección marcado y separado, con una composición de reactivos que comprende:
  - i) por lo menos un co-reactivo, y
  - ii) por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II,

Fórmula I



con  $R_1 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{F}, \text{CH}_2\text{Cl}, \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CHClCH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}, \text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CClHCH}_2\text{CH}_3$  o  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , con  $R_2 = \text{H}$ , y con  $R_3 = \text{H}$ ,

Fórmula II,



- d) inducir electroquímicamente la liberación de luminiscencia y
- e) determinar la señal de electroquimioluminiscencia (EQL), midiendo de esta manera el analito.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la medición de un analito en una muestra utilizando la EQL se lleva a cabo en una solución acuosa.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la amida de ácido carbónico se selecciona de entre el grupo que consiste de acetamida, 2-fluoroacetamida, 2-cloroacetamida, propanamida, 2-cloropropanamida, 3-cloropropanamida, butanamida y 2-clorobutanamida.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la composición de reactivos comprende una amida de ácido carbónico a una concentración de entre 0,01 M y 0,25 M.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la composición de reactivos de la etapa 1c) comprende un conservante.

6. Método según la reivindicación 5, caracterizado por que la composición de reactivos de la etapa 1c) comprende un conservante a una concentración de entre 0,1% y 5%.

7. Método según la reivindicación 5 o 6, caracterizado por que la composición de reactivos de la etapa 1c) comprende un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la composición de reactivos de la etapa 1c) comprende un detergente y un agente tamponador.

9. Método según la reivindicación 8, caracterizado por que la composición de reactivos de la etapa 1c) comprende además una sal y/o un agente antiespumante.

10. Composición de reactivos para determinar la EQL, que comprende:

- i) un compuesto seleccionado de entre el grupo de las amidas de ácido carbónico de fórmulas I y II, y
- ii) por lo menos un co-reactivo, en el que el co-reactivo se selecciona de entre el grupo de las aminas terciarias (por ejemplo tripropilamina (TPA)), oxalato y persulfato.

11. Composición de reactivos según la reivindicación 10, caracterizada por que la composición de reactivos contiene además un conservante seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido bórico y borato.

12. Mezcla de reactivos para determinar la EQL, que comprende una composición de reactivos según la reivindicación 10 o 11, una muestra que debe investigarse y por lo menos un reactivo de detección marcado con un grupo electroquimioluminiscente.
- 5 13. Utilización de una composición de reactivos según la reivindicación 10 o 11 en la determinación de la EQL.
14. Utilización de una amida de ácido carbónico seleccionada de entre el grupo de fórmulas I y II para la realización de un procedimiento de detección electroquimioluminiscente.
- 10 15. Kit para medir la EQL, que contiene una composición de reactivos según la reivindicación 10 o 11.

Fig. 1

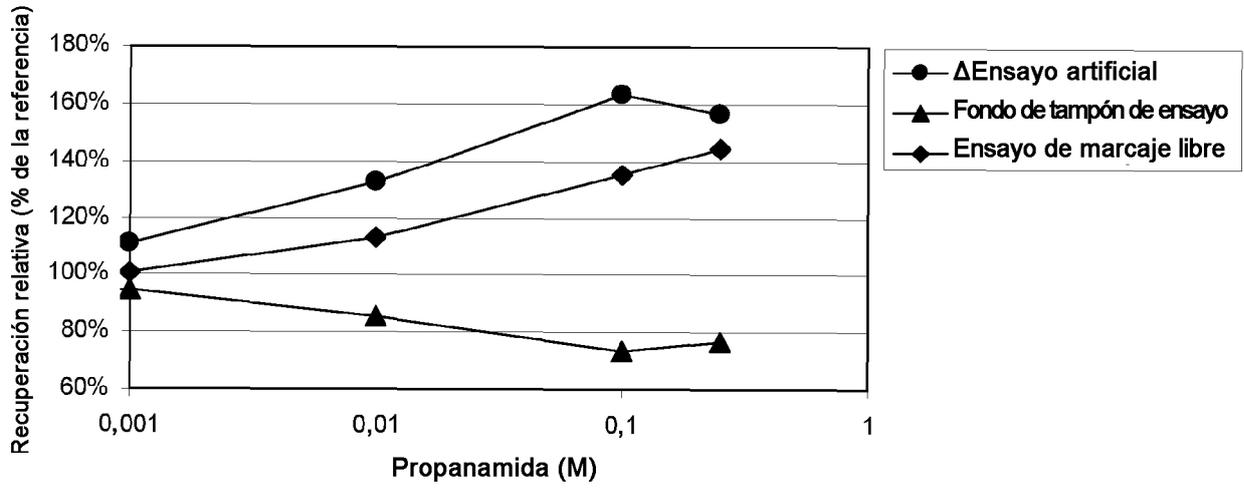


Fig. 2

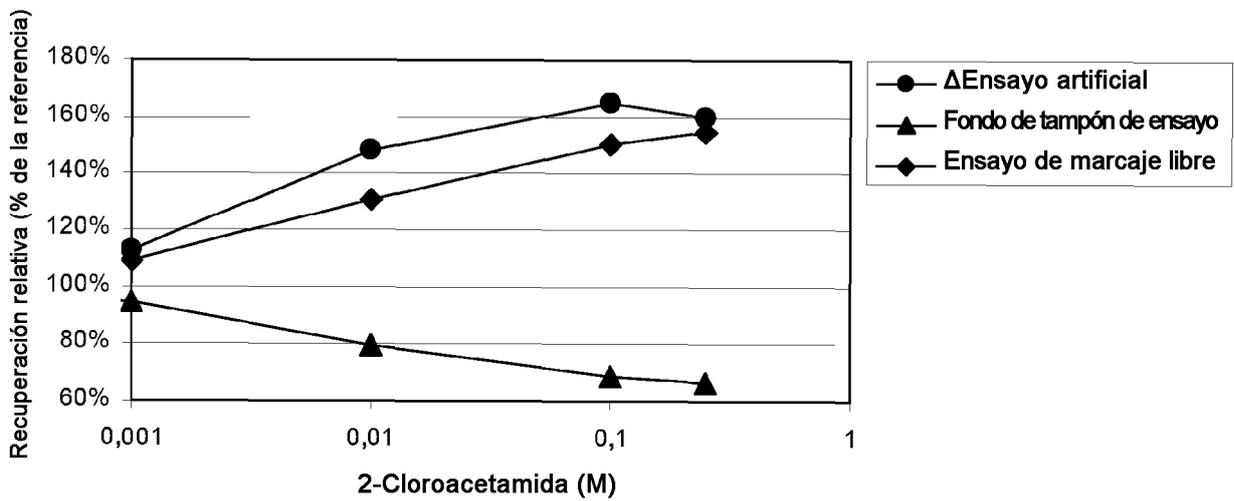


Fig. 3

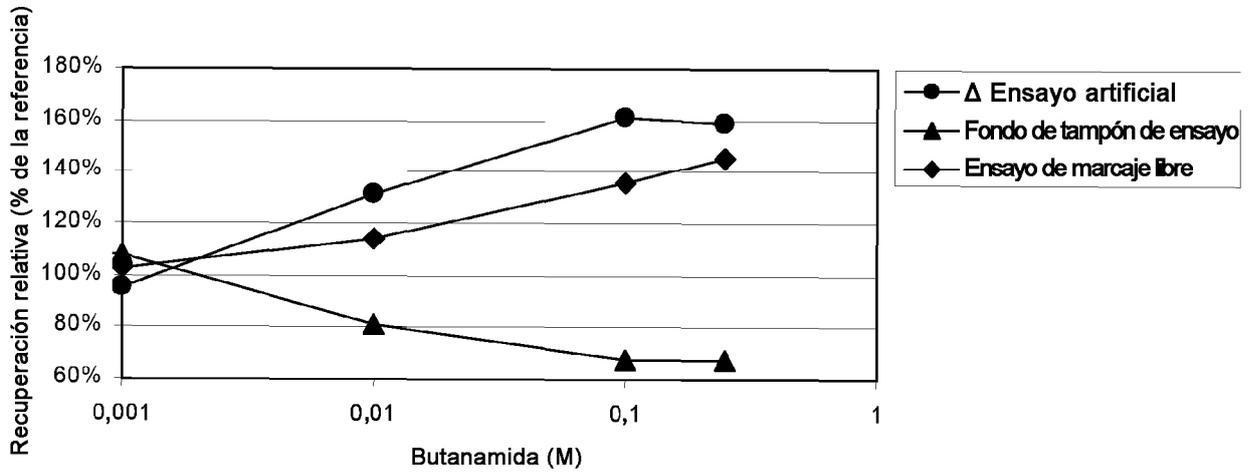
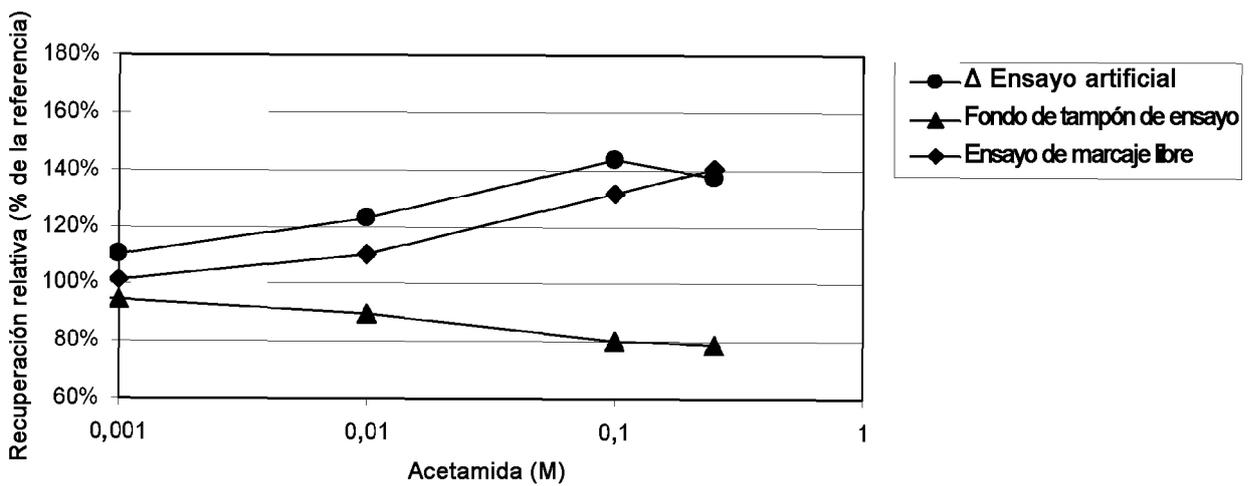


Fig. 4



**Fig. 5**

