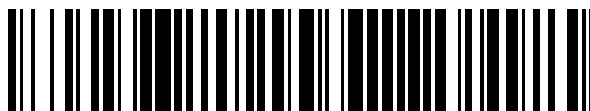


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 977**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/28 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2010** **PCT/US2010/025657**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010** **WO10099486**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2010** **E 10707170 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017** **EP 2401392**

54 Título: **Ensayos homogéneos con fase de disolución**

30 Prioridad:

27.02.2009 US 156473 P
01.02.2010 US 300318 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2017

73 Titular/es:

BECKMAN COULTER, INC. (100.0%)
250 South Kraemer Boulevard
Brea, CA 92821, US

72 Inventor/es:

AKHAVAN-TAFTI, HASHEM;
BINGER, DEAN;
DE SILVA, RENUKA;
MCLERNON, TERRI;
MENDOZA, JAMES;
ODEGAARD, BRUCE;
SALVATI, MICHAEL;
SHAPIR, NIR;
XIE, WENHUA y
CHEN, YING

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 622 977 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

Ensayos homogéneos con fase de disolución

5 Antecedentes de la invención

Los ensayos de unión específica son métodos de prueba para detectar la presencia o cantidad de una sustancia y se basan en el reconocimiento y unión específicos de compañeros de unión específica. Los inmunoensayos son un ejemplo de un ensayo de unión específica en el cual un anticuerpo se liga a una proteína o compuesto en particular. En este ejemplo un anticuerpo es un miembro de un par de unión específica. Los ensayos de unión de ácido nucleico son otro tipo en el cual las cadenas de ácido nucleico complementarias son el par de unión específica. Los ensayos de unión específica representan un amplio campo tecnológico en crecimiento, que permite la detección exacta de patologías, organismos infecciosos y abuso de drogas. Durante las últimas décadas se ha dedicado gran cantidad de trabajo al diseño de ensayos y metodología de ensayo con la sensibilidad, intervalo dinámico, solidez, amplia aplicabilidad y adecuación a la automatización necesarios. Estos métodos pueden agruparse ampliamente en dos categorías.

Los métodos homogéneos usan una reacción de unión específica de los analitos para modular o crear una señal detectable, sin que sea necesario un paso de separación entre reactivos específicos para analitos y no específicos para analitos. Los formatos heterogéneos se basan en la separación física de compañeros de unión específica marcados de manera que puedan detectarse ligados al analito y libres (no ligados al analito). La separación suele requerir la inmovilización de los reactivos críticos en algún tipo de sustrato sólido, de manera que pueda usarse algún tipo de proceso físico, p. ej., filtración, decantación, aglomeración o separación magnética, y también suelen requerir pasos de lavado para retirar los compañeros de unión específica marcados de manera que puedan detectarse libres.

Cada vez es mayor el uso de métodos de ensayo que dependen de la producción de una señal quimioluminiscente y de relacionarla con la cantidad de analito. Dichos métodos pueden llevarse a cabo con instrumentos relativamente simples y aún así presentar buenas características analíticas. En particular, se ha extendido ampliamente el uso de los métodos que emplean un compañero de unión específica marcado con una enzima para el analito y un sustrato de enzima quimioluminiscente para la detección. Las enzimas marcadoras comunes incluyen la fosfatasa alcalina y la peroxidasa del rábano picante.

La patente US-6.911.305 describe un método para detectar analitos polinucleótidos ligados a un sensibilizador o sonda marcada como sensibilizador sobre una primera película. La película se pone en contacto con una segunda película que tiene un precursor quimioluminiscente inmovilizado. Al excitar el sensibilizador en las películas que forman un sándwich, se genera oxígeno singlete que reacciona con el precursor quimioluminiscente para producir un compuesto quimioluminiscente activable en la segunda película. El compuesto quimioluminiscente activable se hace reaccionar con un reactivo para generar quimioluminiscencia en la segunda película para detectar el analito. Estos métodos no se basan en la reacción de unión específica para poner en contacto los reactivos; sino que la segunda película sirve como dispositivo de entrega de reactivo.

La patente US-6,406,913 describe métodos de ensayo que comprenden el tratamiento de un medio del que se sospecha que contiene un analito en condiciones tales que el analito hace que un fotosensibilizador y un compuesto quimioluminiscente se aproximen a una corta distancia. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete cuando se lo irradia con una fuente de luz; el oxígeno singlete se difunde a través de una solución y activa el compuesto quimioluminiscente cuando está a una corta distancia. El compuesto quimioluminiscente activado posteriormente produce luz. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad de analito en el medio. En una realización, al menos uno de los fotosensibilizadores o el compuesto quimioluminiscente está asociado con una partícula suspendible, y un miembro de un par de unión específica está ligado a él.

Los documentos de publicación de solicitud de patente US-20070264664 y US-20070264665 describen una metodología de ensayo para realizar ensayos de par de unión específica que incluyen la reacción de compuestos quimioluminiscentes inmovilizados con compuestos activadores con una configuración de reactivo en virtud de la reacción de unión específica. No se requieren la separación ni la eliminación del compuesto o activador quimioluminiscente no unido sobrante. Estos formatos de ensayo brindan una comodidad y una flexibilidad operativas superiores para la automatización en comparación con las técnicas de ensayo del estado de la técnica. A pesar de estas ventajas, quienes están a cargo del desarrollo de los ensayos aún buscan mejoras adicionales en el diseño y eficacia del ensayo. Los métodos de ensayo incluidos en esta descripción abordan estas necesidades brindando métodos de ensayo simples con sensibilidad mejorada.

60 Sumario

La invención se define en las reivindicaciones. Se describen métodos, reactivos, kits y sistemas para determinar un analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito, en la cual todos los reactivos son solubles en solución acuosa. Un método de ensayo incluye el tratamiento de una muestra que se sospecha que contiene el analito en condiciones tales que, si el analito está presente, un activador es llevado a la configuración reactiva con un compuesto quimioluminiscente para activarlo. La muestra también es tratada con un agente para reducir la señal que no está

relacionada con el analito. Finalmente, se trata la muestra con una solución activadora, lo que produce luz desde el compuesto quimioluminiscente activado. No hay reactivos asociados a una superficie ni a otra fase sólida.

Descripción

Definiciones

Alquilo -- Grupo de hidrocarburos ramificado, de cadena recta o cíclico que contiene de 1 a 20 carbonos que pueden sustituirse con 1 o más sustituyentes distintos del H. Alquilo inferior, en la presente memoria, se refiere a aquellos grupos de alquilos que contienen hasta 8 carbonos.

Analito -- Sustancia en una muestra que será detectada en un ensayo. Se usarán una o más sustancias con una afinidad de unión específica con el analito para detectarlo. El analito puede ser una proteína, un péptido, un anticuerpo o un hapteno para el cual puede crearse un anticuerpo que lo una. El analito puede ser un ácido nucleico o un oligonucleótido unido mediante un ácido nucleico o un oligonucleótido complementario. El analito puede ser cualquier otra sustancia que sea miembro de un par de unión específica. Otros ejemplos de tipos de analitos incluyen drogas como esteroides, hormonas, proteínas, glicoproteínas, mucoproteínas, nucleoproteínas, fosfoproteínas, drogas de abuso, vitaminas, antibacterianos, antifúngicos, antivirales, purinas, agentes antineoplásicos, anfetaminas, compuestos de azepina, nucleótidos y prostaglandinas, así como metabolitos de estas drogas, pesticidas y metabolitos de pesticidas y receptores. El analito también incluye células, virus, bacterias y hongos.

Activador: un compuesto, que también puede mencionarse como marca, que provoca la activación del compuesto quimioluminiscente de manera que, ante la presencia de un disparador, se produce la quimioluminiscencia.

Miembro de unión específica (sbm) marcado con activador o conjugado de activador-miembro de unión específica - un reactivo en la mezcla de ensayos que incluye al menos lo siguiente en una configuración conectada: a) un miembro de una unión específica de un analito y b) un compuesto activador o marca que provoca la activación de un compuesto quimioluminiscente.

Anticuerpo -- incluye todas las inmunoglobulinas así como los fragmentos nativos y diseñados.

Aralquilo -- Grupo alquilo sustituido por un grupo arilo. Entre los ejemplos se incluyen bencilo, bencihidrido, tritilo y feniletilo.

Arilo -- Grupo con anillo aromático que contiene de 1 a 5 anillos carobcíclicos, que pueden ser sustituidos por 1 o más sustituyentes distintos del H.

Material biológico -- incluye, por ejemplo, sangre entera, sangre entera anticoagulada, plasma, suero, tejido, células animales y vegetales, contenido celular, virus y hongos.

Compuesto quimioluminiscente -- Un compuesto, al que también se puede llamar marca, que sufre una reacción para causar la emisión de luz, por ejemplo, siendo convertido en otro compuesto formado en un estado electrónicamente excitado. El estado excitado puede ser singlete o triplete. El estado excitado puede emitir luz directamente al relajarse al estado fundamental o puede transferir energía de excitación a un aceptor de energía emisivo, volviendo así al estado fundamental. El aceptor de energía se eleva a un estado excitado en el proceso y emite luz.

Sbm inmóvil con marca quimioluminiscente - un reactivo en la mezcla de ensayos que incluye al menos lo siguiente en una configuración conectada: a) un miembro de una unión específica de un analito y b) un compuesto quimioluminiscente o marca y c) una fase sólida.

Conectado -- En la presente memoria, indica que dos o más especies químicas o materiales de soporte están vinculados químicamente, p. ej., por una o más uniones covalentes, o están unidos pasivamente, p. ej., por absorción, atracción iónica o un proceso de unión específica como la unión por afinidad. Cuando estas especies o materiales están conectados entre sí, puede haber más de un tipo de conexión involucrada.

Dosis respuesta - señal, tal como la salida quimioluminiscente de un ensayo de reacción relacionada con la cantidad de analito que se está determinando en la muestra.

Heteroalquilo -- Grupo alquilo en el cual al menos uno de los átomos de carbono del anillo o de la cadena no terminal es reemplazado por un heteroátomo seleccionado de N, O o S.

Heteroarilo -- Grupo arilo en el cual uno a tres de los átomos de carbono del anillo es reemplazado por un heteroátomo seleccionado de N, O o S. Entre los grupos de ejemplo se incluyen los grupos piridilo, pirrolilo, tienilo, furilo, quinolilo y acridinilo.

Muestra -- Mezcla que contiene, o que se sospecha que contiene, un analito a ser medido en un ensayo. Los analitos incluyen por ejemplo, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hormonas, anticuerpos, drogas y esteroides. Las muestras

típicas que pueden usarse en los métodos de la descripción incluyen fluidos corporales tales como sangre, que puede ser anticoagulada tal como se la encuentra comúnmente en las muestras de sangre recolectadas, plasma, suero, orina, semen, saliva, cultivos celulares, extractos de tejidos y similares. Otros tipos de muestras incluyen solventes, agua de mar, muestras de agua industrial, muestras de alimentos y muestras ambientales tales como suelo o agua, materiales vegetales, eucariotas, bacterias, plásmidos, virus, hongos y células originadas por procariotas.

Compañero de unión específica (sbp) -- Un miembro de un par de unión específica o un compañero de unión específica es una molécula, incluidas las moléculas biológicas, que tiene afinidad de unión específica con otra sustancia (p. ej., analito. Dos compañeros de unión específica para un analito, preferiblemente con diferentes sitios de unión en el analito, se conocen como par de unión específica.

SSIA, (Selective Signal Inhibiting Agent - Inhibidor selectivo de señal)— *Compuesto* proporcionado en una mezcla de reacción de un ensayo de la presente descripción que reduce la señal no específica o la señal de fondo en mayor medida que la señal específica del analito generada por la reacción de producción de quimioluminiscencia de la mezcla de reacción del ensayo.

Soporte sólido — un material de al menos 1 micrón con una superficie sobre la que se inmovilizan los componentes del ensayo. Los materiales pueden tener forma de partículas, micropartículas, nanopartículas, coloides metálicos, fibras, hojas, perlas, membranas, filtros y otros soportes tales como tubos de ensayo, micropozos, chips, portaobjetos de vidrio y micromatrices.

Soluble, solubilidad, solubilizar - Capacidad o tendencia de una sustancia a mezclarse de manera uniforme con otra. En la presente descripción, solubilidad y los términos relacionados suelen referirse a la propiedad de un sólido en un líquido, por ejemplo SSIA en un tampón acuoso. Los sólidos son solubles en la medida en que pierden su forma cristalina y pasan a estar molecular o iónicamente disueltos o dispersos en el solvente (p. ej. líquido) para formar una verdadera solución. En contraste: sistemas de dos fases en los que una fase está formada por partículas pequeñas (incluidas micropartículas o partículas de tamaño coloidal) distribuidas en una sustancia, estabilizadas para evitar la precipitación o no estabilizadas.

Sustituido -- Se refiere al reemplazo de al menos un átomo de hidrógeno en un grupo por un grupo distinto del hidrógeno. Debe destacarse que al hacer referencia a grupos sustituidos se pretende indicar que puede haber presentes múltiples puntos de sustitución salvo que se indique claramente lo contrario.

Recipiente de reacción -- Recipiente o aparato para contener la muestra y otros componentes de un ensayo según la presente invención. Se incluyen, por ejemplo, tubos de ensayo de diversos tamaños y formas, y placas de micropocillos.

Descripción

La presente descripción brinda métodos de ensayo homogéneos, en particular métodos de ensayo homogéneos que usan detección por quimioluminiscencia de analitos después de la unión de un conjugado de compañero de unión específica marcado con un quimioluminiscente y un compañero de una unión específica marcado con un activador y el analito. Los ensayos y métodos homogéneos se realizan sin separar los compañeros de unión específica libres de los compañeros de unión específica ligados en complejos.

La presente descripción ofrece ensayos homogéneos rápidos y simples para detectar la presencia, ubicación o cantidad de sustancias por medio de reacciones de pares de unión específica. Los ensayos requieren el uso de un compuesto quimioluminiscente conectado con un primer compañero de unión específica ("sbp marcado con quimioluminiscente"), un compuesto activador conjugado con un segundo compañero de unión específica ("sbp marcado con activador"), un inhibidor selectivo de señal ("SSIA"), un potenciador, en fase de solución y una solución activadora.

A diferencia de otros ensayos homogéneos, una realización básica de esta descripción, todos los reactivos, incluidos el sbp marcado con activador y el sbp marcado con quimioluminiscente son solubles en solución acuosa. En efecto, los ensayos que se incluyen en esta descripción no requieren ni utilizan una fase sólida. Los métodos de ensayo presentes también difieren de otros métodos de ensayo homogéneos porque no requieren componentes especializados, concretamente, miembros de un par de unión específica marcados que están diseñados con un componente detectable que esté inactivo o solo capaces de generar la señal detectable después de que se unen en un complejo con otro componente. A diferencia del sistema de ensayos incluido de la presente descripción, la preparación de otros sistemas de ensayo homogéneos es compleja, difícil o costosa porque requieren este tipo de componentes especializados. Los presentes ensayos tienen un enfoque más simple y más flexible del diseño y desarrollo del ensayo, y permiten una aplicación más rápida a una amplia variedad de analitos. La diferencia de los presentes métodos de ensayo con los métodos de ensayo basados en la separación u heterogéneos convencionales es que los primeros no usan un paso de separación o un proceso para diferenciar compañeros de unión específica libres de compañeros de unión específica unidos en complejos. Al usar los métodos de ensayo presentes que evitan las separaciones, se simplifica la ejecución de los ensayos, es posible reducir los tiempos de los ensayos y se facilita la automatización.

En los métodos de ensayo de la presente descripción se reúnen un sbp marcado con un quimioluminiscente, un sbp marcado con un activador y un inhibidor selectivo de señal ("SSIA") en una solución acuosa con una muestra. En

una realización, cuando el analito reconocido por los miembros del sbp está presente en la muestra, el sbp marcado con quimioluminiscente y el sbp marcado con activador se unen cada uno a diferentes áreas del analito. Se genera la señal específica relacionada con el analito y comienza la detección al agregarse una solución activadora. En otra realización, se proporciona un análogo del analito marcado con quimioluminiscente para ser usado en un formato de ensayo competitivo. El analito y el análogo marcado con quimioluminiscente se unen competitivamente al sbp marcado con activador. Es posible formar previamente complejos de análogo marcado con quimioluminiscente y sbp marcado con activador y agregar el analito para desplazar el análogo marcado en una realización de un ensayo de unión competitiva. En otra realización, es posible mezclar el análogo marcado con quimioluminiscente, el analito y el sbp marcado con activador sin formar previamente los complejos de unión. Se genera la señal específica relacionada con el analito y comienza la detección al agregarse una solución activadora. La señal está inversamente relacionada con la concentración de analito en este formato de ensayo.

Como resultado de la unión de los compañeros de unión específica al analito, un activador es llevado a una proximidad que le permita actuar con respecto a un compuesto quimioluminiscente, de manera que pueda activar una reacción que genere quimioluminiscencia al agregarse la solución activadora. La reacción del activador con el compuesto quimioluminiscente activa o altera el compuesto quimioluminiscente de manera tal que, al ser tratado con una solución activadora, se produce otra reacción que da como resultado la generación de luz. Proximidad que le permita actuar significa que el compuesto quimioluminiscente y el activador están lo suficientemente cerca, incluido y hasta el contacto físico, como para reaccionar. Es posible proporcionar al sistema cantidades sobrantes de compañero de unión específica marcado con activador o de compañero de unión específica marcado con quimioluminiscente con respecto a la cantidad necesaria para determinar la concentración de analito. El sbp no unido marcado con activador y/o el conjugado quimioluminiscente no unido sobrante no se retira antes del agregado de la solución activadora y de la detección, ya que su presencia y la falta de fase sólida en el sistema de ensayo no impiden que la señal de detección de quimioluminiscencia sea correlacionada de manera exacta con la cantidad de analito. Debido a que los compañeros de unión específica marcados no unidos pueden ser sometidos a la misma reacción de detección quimioluminiscente y a que los reactivos no están conectados a una fase sólida, se esperaría una correlación que no es útil, o a lo sumo, muy limitada de señal con el analito. Esta característica, según la creencia popular, haría que los ensayos fallaran.

Sorprendentemente, este problema ha sido superado con el uso de un inhibidor selectivo de señal en los métodos presentes. En los métodos presentes, los reactivos que están en solución sin conexión con una fase sólida y en presencia de activador sobrante y/o compuesto quimioluminiscente sobrante, que no se elimina, no hacen fracasar la capacidad de realizar ensayos de unión sensibles específicos dependientes de la concentración de analito. Este hallazgo no se esperaba ni era predecible. En especial, cuando el activador es un catalizador, tal como una enzima, que normalmente induciría de cientos a miles de transformaciones reactivas por segundo cuando la molécula en la que reacciona está libre en solución, no se habría esperado que el activador de unión pudiera ser discriminado de manera útil de la reacción del activador libre con el fin de producir una señal que responda a la dosis en un intervalo amplio de concentraciones de analito. Los inventores han descubierto estos excelentes resultados de discriminación resultante del agregado de ciertos compuestos de SSIA. Al usar el SSIA, se mejora drásticamente la proporción entre la señal producida por la reacción entre la marca quimioluminiscente y la marca del activador, ambas en una configuración reactiva por medio de un complejo de miembros de un par de unión específica marcados con un analito, y la señal de las marcas presentes pero no en dicho complejo.

La función del SSIA en la mejora de la sensibilidad del ensayo se entiende haciendo referencia al Esquema 1. Es posible que múltiples combinaciones diferentes de sbp marcados con quimioluminiscente ("CLSBP") libres (p. ej., no unidos al analito) y complejos (p. ej., unidos al analito) y par de unión específica marcado con activador ("ALSBP") contribuyan con la señal quimioluminiscente observada cuando se agrega la solución activadora. A continuación, se indican cuatro esquemas de reacción propuestos:

- 1 ALSBP unido + CLSBP unido → Señal específica
- 2 ALSBP unido + CLSBP libre → Señal no específica
- 3 ALSBP libre + CLSBP unido → Señal no específica
- 4 ALSBP libre + CLSBP libre → Señal no específica

Tal como se muestra en la lista anterior, cuatro tipos diferentes de pares de quimioluminiscente-activador pueden reaccionar en la mezcla de reacción; sin embargo solo el primer tipo produce una señal que puede relacionarse con la cantidad de analito en un ensayo. El SSIA logra su sorprendente función al inhibir o deprimir selectivamente la cantidad de señal desde las reacciones 2-4 con respecto a la de la reacción 1. En algunas realizaciones esto puede ocurrir reduciendo las cuatro reacciones, pero reduciendo la señal de 2-4 mucho más en proporción.

En la presente memoria, existen métodos de ensayo de analitos de interés en una muestra por medio de reacciones de unión específica que incluyen al analito y compañeros de unión específica (sbp) del analito, en donde se marca un compañero de unión específica con un compuesto activador que puede ser un catalizador, tal como una enzima, en particular una enzima peroxidasa. Otro compañero de unión específica para el analito se marca con un compuesto quimioluminiscente. La unión de los sbp marcados y el analito forma complejos marcados. El complejo quimioluminiscente es sometido a una reacción quimioluminiscente inducida por el activador cuando se agrega una solución activadora. La quimioluminiscencia resultante está relacionada con la cantidad de analito en la muestra. Las reacciones del par de unión

específica y la reacción quimioluminiscente se realizan con todos los componentes disueltos en una solución acuosa. Significativamente, se proporciona una cantidad sobrante de compañeros de unión específica marcados con respecto a la cantidad de analito en la muestra, de manera que no todos los sbp marcados formen complejos con el analito. Los sbp marcados sobrantes no se retiran de la solución de reacción aunque son capaces de participar en la reacción quimioluminiscente. La reactividad de los sbp marcados que no forman parte de complejos y que no se retiran, generalmente impiden que se realicen estos ensayos homogéneos ya que se generan inaceptables señales altas que no se deben a la presencia de formación de complejo mediada por el analito. En muchos casos, se genera tanta señal de “fondo” que no puede obtenerse ninguna relación dosis-respuesta útil. Con el fin de poder realizar un ensayo de no separación homogénea cuando todos los componentes de la reacción necesarios para la generación de la señal quimioluminiscente están presentes, tanto en el complejo de unión como en forma libre o no unida, es necesario proporcionar medios para discriminar sbp marcados unidos y no unidos, distintos de una separación física. La presente invención brinda una solución largamente buscada a este problema y brinda métodos de ensayo en donde todos los componentes están en solución, no se realiza separación. A diferencia de los métodos de ensayo homogéneos conocidos, los métodos presentes no requieren ni usan compañeros de unión marcados diseñados especialmente que no puedan ser sometidos a la reacción de producción de señal, salvo que se los ponga en un complejo de unión.

En los métodos de ensayo aquí descritos, la discriminación necesaria de los miembros sbp marcados unidos en un complejo con el analito de los miembros sbp marcados no unidos libres se logra proporcionando un Inhibidor selectivo de señal (SSIA) a la solución de reacción. El agregado de una cantidad eficaz de SSIA a la solución de reacción hace que la señal de los miembros sbp unidos marcados (señal) supere a la señal de fondo, incluida toda contribución de señal de miembros sbp no unidos marcados en un grado significativamente superior al que se da en su ausencia. Cuando se logra esta mejora de la relación de la señal de fondo, aumenta la utilidad de los ensayos, incluidos mayores niveles de sensibilidad de detección.

En la presente memoria se describen métodos de ensayo, en particular métodos de ensayo de unión, en los cuales se llevan a una proximidad que les permita actuar a un sbp marcado con quimioluminiscente y un sbp marcado con activador por medio de al menos una reacción de unión específica debido a la presencia de un analito, en donde el sbp unido marcado con activador activa una reacción que genera quimioluminiscencia cuando se le agrega una solución activadora para detectar la presencia, ubicación y cantidad del analito.

En una realización, los presentes métodos también difieren de los métodos de prueba convencionales en que no se retira el sbp no unido marcado con activador presente en gran exceso con respecto a la cantidad conectada específicamente con el analito. No se requiere lavar ni separar el sbp no unido marcado con activador sobrante. En otra realización, en los presentes métodos tampoco se retira el conjugado quimioluminiscente no unido presente en exceso con respecto a la cantidad conectada específicamente con el analito. No se requiere lavar ni separar el conjugado quimioluminiscente no unido sobrante.

Es posible agregar secuencialmente los componentes del ensayo, a saber: muestra que contiene el analito, sbp marcado con activador, sbp marcado con quimioluminiscente, inhibidor selectivo de señal y solución activadora, a un recipiente de ensayo, sin lavar ni separar, y leer la luminiscencia. Los componentes del ensayo, salvo la solución activadora que se agrega última, pueden agregarse en cualquier orden o combinación al recipiente de ensayo. En una realización, la muestra y el sbp marcado con activador pueden premezclarse y agregarse al recipiente de ensayo que contiene el sbp marcado con quimioluminiscente antes de introducir la solución activadora.

Los ensayos convencionales que usan sustratos quimioluminiscentes y conjugados marcados con enzimas proporcionan un gran exceso de sustrato quimioluminiscente con respecto a la cantidad de enzima marcadora. Con frecuencia, la relación molar sustrato/enzima puede superar las nueve potencias de diez, es decir, un exceso de mil millones de veces. En los ensayos convencionales se considera necesario proporcionar tal enorme exceso de compuesto quimioluminiscente para garantizar un suministro adecuado de sustrato, para tener una recuperación enzimática continua y para que este proceso garantice una sensibilidad de detección adecuada en los métodos de ensayo. Quienes lo aplican han descubierto que es posible diseñar métodos de ensayo altamente sensibles que reducen la proporción entre compuesto quimioluminiscente y activador en varios órdenes de magnitud. En este sentido, estos métodos aquí descritos difieren fundamentalmente de los métodos de ensayo unidos a enzimas conocidos.

La eliminación de los pasos de lavado y separación descrita anteriormente, y tal como se demuestra en los ensayos de ejemplo descritos más adelante, brinda la oportunidad de simplificar el diseño de los protocolos de ensayo. La cantidad reducida de pasos operativos reduce el tiempo del ensayo, la variabilidad interanalítica de un lavado incompleto y el coste. Al mismo tiempo, mejora la capacidad de automatizar y miniaturizar la ejecución del ensayo con todas las ventajas inherentes de la automatización y la miniaturización.

Los ensayos realizados según los presentes métodos incluyen proporcionar un compañero de unión específica (“sbp”) para unir o capturar específicamente un analito de interés. El compañero de unión específica es capaz de unirse directa o indirectamente a un analito que se desea detectar. Además, el compañero de unión específica tiene un compuesto de marcado quimioluminiscente unido directa o indirectamente a él. La marca quimioluminiscente puede proporcionarse de varias maneras diferentes, tal como se describe en detalle más adelante. En cada variante, la marca quimioluminiscente está estable o irreversiblemente conectada, ya sea de

manera directa o indirecta con un compañero de unión específica de manera tal que se mantenga la solubilidad acuosa del “sbp marcado con quimioluminiscente”. El término “irreversiblemente” indica que la marca quimioluminiscente no se elimina sustancialmente del sbp marcado con quimioluminiscente en las condiciones de uso del ensayo en cuestión. También se contempla el anclaje pasivo o no covalente siempre que la marca se una y se retenga de manera estable en el sbp marcado con quimioluminiscente en las condiciones de uso.

El ensayo además incluye proporcionar un sbp marcado con activador que contiene el analito y el compañero de unión específica conectado al sbp marcado con quimioluminiscente para el analito y que permite que los componentes formen complejos de unión específica. La muestra, el sbp marcado con quimioluminiscente y el sbp marcado con activador pueden agregarse por separado en cualquier orden o combinación secuencial o simultáneamente, o puede premezclarse y agregarse como una combinación. En general, se necesitará un tiempo para permitir la unión del analito a los miembros sbp marcados. Esto puede lograrse en algunas realizaciones en las que los componentes de unión se agregan secuencialmente con un retardo opcional para permitir que ocurran las reacciones de unión.

Una vez formado el complejo de unión, se agrega una solución activadora para producir la quimioluminiscencia para detectar el analito y se detecta la quimioluminiscencia. En general, se integra el nivel de intensidad de luz pico o la intensidad de la luz para un intervalo fijo, o se mide la intensidad total integrada de la luz. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad de analito presente en la muestra contenida en el recipiente de reacción. La cantidad de luz puede usarse para determinar la cantidad numérica de analito construyendo una curva de calibración según métodos generalmente conocidos. Cuando la emisión de luz sucede con rapidez al agregarse la solución activadora, es deseable medir mecánicamente el inicio de la medición de la adición por medio de un inyector adecuado o realizar la adición con el recipiente de reacción ya expuesto al detector. Las cantidades óptimas de reactivos, volúmenes, diluciones, tiempos de incubación de reacciones de pares de unión específica, concentración de reactivos, etc., pueden determinarse rápidamente mediante experimentos de rutina, por referencia a tratados estándar sobre métodos para realizar ensayos de unión específica y usando como guía los ejemplos específicos descritos en detalle más adelante.

La concentración o cantidad de miembros sbp usadas en los presentes métodos y ensayos dependerá de factores tales como la concentración de analito, la velocidad de unión/tiempo de ensayo deseados, el coste y la disponibilidad de conjugados, el grado de unión no específica de los miembros de sbp. En general, la presencia de miembros sbp será al menos igual a la concentración mínima de analito anticipada, más frecuentemente al menos la concentración de analito más alta esperada o superior, y para ensayos no competitivos, las concentraciones pueden ser de 10 veces a 10^6 veces la concentración de analito mayor. En general, la concentración de miembros sbp es inferior a 10^{-4} M, preferiblemente inferior a 10^{-6} M, frecuentemente entre 10^{-11} y 10^{-7} M. La cantidad de activador o de compuesto quimioluminiscente conectado con un miembro sbp será usualmente al menos una molécula por miembro sbp y puede ser de hasta 10^2 , más. En muchas realizaciones, la cantidad de activador o compuesto quimioluminiscente conectado con un miembro sbp es de 1 a 20 moléculas. En los ejemplos trabajados se muestran ejemplos y otras proporciones de activador y compuesto quimioluminiscente.

SBP marcado con quimioluminiscente

Los métodos exigen el uso de un compuesto quimioluminiscente conectado con un primer compañero de unión específica (“sbp marcado con quimioluminiscente”),

En los ensayos y métodos de la presente descripción, el sbp marcado con quimioluminiscente es soluble en solución acuosa. En los ensayos y métodos de la presente descripción, el compuesto marcador quimioluminiscente no está inmovilizado en una superficie sólida, tal como una partícula, placa multipozos o membrana, filtro, tubo de ensayo, tira reactiva o punta de pipeta como se encuentra en otros ensayos y métodos de afinidad.

El sbp marcado con quimioluminiscente incluye un compuesto con marca quimioluminiscente y un miembro del par de unión específica.

En algunas realizaciones, un sbp marcado con quimioluminiscente incluye uno o más compuestos con marca quimioluminiscentes.

En algunas realizaciones, un sbp marcado con quimioluminiscente incluye una o más copias de un miembro de un par de unión específica.

En algunas realizaciones, un compuesto con marca quimioluminiscente está directamente conectado a una o más copias de un miembro de un par de unión específica. En algunas otras realizaciones, uno o más compuestos con marca quimioluminiscente están directamente conectados a una copia de un miembro de un par de unión específica. Las conexiones directas, también llamadas con marcado directo, incluyen interacciones de unión covalente, interacciones de unión iónica e interacciones hidrofóbicas. En una realización, la marca quimioluminiscente está unida de manera covalente a un compañero de unión específica del analito.

En algunas realizaciones, un compuesto con marca quimioluminiscente está indirectamente conectado a una o más copias de un miembro de un par de unión específica. En algunas otras realizaciones, uno o más compuestos

con marca quimioluminiscente están indirectamente conectados a una copia de un miembro de un par de unión específica. Las conexiones indirectas incluyen una o más sustancias auxiliares además de un compuesto con marca quimioluminiscente y un miembro de un par de unión específica.

- 5 Las sustancias auxiliares son solubles en solución acuosa. Los sbp con marca quimioluminiscente que incluyen una o más sustancias auxiliares son solubles en solución acuosa.

En diversas realizaciones, las sustancias auxiliares incluyen proteínas solubles (p. ej., estreptavidina, avidina, neutravidina, biotina, BSA cationizada, hemocianina de lapa californiana “KLH”, inmunoglobulinas y fragmentos
10 o porciones de los mismos, ya sean nativos o diseñados, dendrímeros sintéticos solubles (p. ej., PAMAM), polímeros sintéticos solubles (p. ej., ácido poliacrílico “PAA”), polímeros naturales solubles (p. ej., polisacáridos como dextranos funcionalizados, amino dextrán, oligonucleótidos, proteínas y cualquier combinación de los mismos), liposomas, micelas y vesículas, así como las combinaciones de uno o más polímeros sintéticos solubles, polímeros naturales solubles y proteínas solubles (p. ej. IgG/Biotina/estreptavidina/PAA). Se anticipa el
15 uso de otras sustancias auxiliares solubles en solución acuosa y funcionalizables para unión a uno o más compuestos con marca quimioluminiscente y/o sbp en los métodos y ensayos descritos.

En algunas realizaciones, la sustancia auxiliar a la que está unida la marca quimioluminiscente de manera covalente es una proteína o un péptido. Entre los ejemplos de proteínas solubles se incluyen albúminas, avidinas,
20 estreptavidina, avidina, proteínas alfa-hélice, fos, jun, hemocianina de lapa de ojo de cerradura “KLH”, inmunoglobulinas y fragmentos o porciones de los mismos, ya sean nativos o diseñados, y cualquier combinación de los mismos. En una realización, la sustancia auxiliar es un anticuerpo universal, tal como IgG, en donde la marca quimioluminiscente está unida covalentemente a un anticuerpo universal de manera que pueda mantener su afinidad de unión para un anticuerpo de captura específica de analito. En otra realización de sbp marcado con
25 quimioluminiscente, el compuesto quimioluminiscente está conectado a uno o más sbp mediante una unión biotina-estreptavidina o biotina-neutravidina. El sbp marcado con quimioluminiscente que incorpora la estreptavidina-biotina, o uniones equivalentes, puede brindar, por ejemplo, el compañero de unión específica como conjugado de biotina en donde el compuesto quimioluminiscente es un conjugado de estreptavidina. Las disposiciones alternativas de biotina-estreptavidina y uniones similares son de conocimiento general. Alternativamente, los sbp marcados con
30 quimioluminiscente que incorporan estreptavidina-biotina, o uniones equivalentes, pueden usar la unión para el anclaje de sbp o compuestos quimioluminiscentes a una o más sustancias auxiliares adicionales.

En otra realización, la sustancia auxiliar a la que está unida la marca quimioluminiscente de manera covalente es un polímero sintético. Los formatos de ensayo que usan auxiliares poliméricos para conectar el compuesto
35 quimioluminiscente pueden conectarse al compañero de unión específica del analito por unión covalente, como conjugado biotina-avidina, o por unión indirecta a través de un componente de captura universal tal como una inmunoglobulina específica de una especie. An

En realizaciones seleccionadas, el sbp marcado con quimioluminiscente incluye una sustancia auxiliar seleccionada de polisacáridos o proteínas solubles autoensamblantes. En algunas realizaciones, el sbp marcado con quimioluminiscente incluye un polisacárido tal como un amino dextrano o un carboxilo dextrano. En las realizaciones de este tipo, un polisacárido, tal como un amino dextrano o un carboxilo dextrano, tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 10 kDa a 500 kDa, y en otras realizaciones, tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 25-150 kDa. En otra realización, un sbp marcado con quimioluminiscente incluye un
45 polisacárido, tal como el amino dextrano o el carboxilo dextrano con un peso molecular promedio en el intervalo de 50-100 kDa. En otra realización más, un sbp marcado con quimioluminiscente incluye un polisacárido, tal como el amino dextrano o el carboxilo dextrano con un peso molecular promedio de 70 kDa.

En varias realizaciones, el diámetro medio del sbp marcado con quimioluminiscente está dentro del intervalo inclusivo de 5 nM a 800 nM. En realizaciones seleccionadas, con proteínas solubles, u otros polímeros naturales solubles o polímeros sintéticos solubles, o combinaciones de los mismos, el diámetro medio del sbp marcado con quimioluminiscente está en el intervalo inclusivo de 200 nM a 600 nM, en algunas otras realizaciones, en el intervalo inclusivo de 300 nM a 500 nM.

SBP marcados con activador

55 Los métodos exigen el uso de un compuesto activador conectado con un primer compañero de unión específica (“sbp marcado con activador”),

En los ensayos y métodos de la presente descripción, el sbp marcado con activador es soluble en solución acuosa. En los ensayos y métodos de la presente descripción, el compuesto activador no está inmovilizado en una superficie sólida, tal como una partícula, placa multipozos o membrana, filtro, tubo de ensayo, tira reactiva o punta de pipeta como se encuentra en otros ensayos y métodos de afinidad.

El sbp marcado con activador incluye un compuesto con marca de activador y un miembro del par de unión específica.

En algunas realizaciones, un sbp marcado con activador incluye uno o más compuestos activadores.

En algunas realizaciones, un sbp marcado con activador incluye una o más copias de un miembro de un par de unión específica.

En algunas realizaciones, un compuesto activador está directamente conectado a una o más copias de un miembro de un par de unión específica. En algunas otras realizaciones, uno o más compuestos con marca de activador están directamente conectados a una copia de un miembro de un par de unión específica. Las conexiones directas, también mencionadas como marcaje directo, incluyen interacciones de unión covalente, interacción de unión iónica e interacciones hidrofóbicas. En una realización, la marca de activador está unida de manera covalente a un compañero de unión específica del analito.

En algunas realizaciones, un compuesto activador está indirectamente conectado a una o más copias de un miembro de un par de unión específica. En algunas otras realizaciones, uno o más compuestos activadores están indirectamente conectados a una copia de un miembro de un par de unión específica. Las conexiones indirectas incluyen sustancias auxiliares además de un compuesto con marca quimioluminiscente y un miembro de un par de unión específica.

Las sustancias auxiliares suelen ser solubles en solución acuosa. Los sbp marcados con activador que incluyen una o más sustancias auxiliares son solubles en solución acuosa. En diversas realizaciones, las sustancias auxiliares incluyen proteínas solubles (p. ej., estreptavidina, avidina, neutravidina, biotina, BSA cationizada, hemocianina de lapa de ojo de cerradura "KLH", inmunoglobulinas y fragmentos o porciones de los mismos, ya sean nativos o diseñados, y cualquier combinación de los mismos, dendrímeros sintéticos solubles (p. ej., PAMAM), polímeros sintéticos solubles (p. ej., ácido poliácrico "PAA"), polímeros naturales solubles (p. ej., polisacáridos como dextrano, oligonucleótidos, proteínas y cualquier combinación de los mismos), liposomas, micelas y vesículas, así como las combinaciones de uno o más polímeros sintéticos solubles, polímeros naturales solubles y proteínas solubles (p. ej. IgG/Biotina/estreptavidina/PAA). Se anticipa el uso de otras sustancias auxiliares solubles en solución acuosa y funcionalizables para unión a uno o más compuestos con marca de activador y/o sbp en los métodos y ensayos descritos.

En algunas realizaciones la sustancia auxiliar a la que está unida la marca de activador de manera covalente es una proteína o un péptido. Entre los ejemplos de proteínas solubles se incluyen albúminas, avidinas, estreptavidina, avidina, proteínas alfa-hélice, fos, jun, hemocianina de lapa de ojo de cerradura "KLH", inmunoglobulinas y fragmentos o porciones de los mismos, ya sean nativos o diseñados, y cualquier combinación de los mismos. En una realización, la sustancia auxiliar es un anticuerpo universal, tal como IgG, en donde la marca de activador está unida covalentemente a un anticuerpo universal de manera pueda mantener su afinidad de unión para un anticuerpo de captura específica de analito. En otra realización de sbp marcado con activador, el compuesto activador está conectado a uno o más sbp mediante una unión biotina-estreptavidina. El sbp marcado con activador que incorpora la estreptavidina-biotina, o uniones equivalentes, puede brindar por ejemplo el compañero de unión específica como conjugado de biotina en donde el compuesto activador es un conjugado de estreptavidina. Las disposiciones alternativas de biotina-estreptavidina y uniones similares son de conocimiento general. Alternativamente, los sbp marcados con activador que incorporan estreptavidina-biotina, o uniones equivalentes, pueden usar la unión para el anclaje de sbp o compuestos activadores a una o más sustancias auxiliares adicionales.

En otra realización, la sustancia auxiliar a la que está unida la marca de activador de manera covalente es un polímero sintético. Los formatos de ensayo que usan auxiliares poliméricos para conectar el compuesto activador pueden conectarse al compañero de unión específica del analito por unión covalente, unión no covalente o por unión indirecta a través de un componente de captura universal tal como una inmunoglobulina específica de una especie o una conjugación biotina-avidina.

En realizaciones seleccionadas, el sbp marcado con activador incluye una sustancia auxiliar seleccionada de polisacáridos o proteínas solubles autoensamblantes. En algunas realizaciones, un sbp marcado con activador incluye un polisacárido tal como un amino dextrano o un carboxilo dextrano. En las realizaciones de este tipo, un polisacárido, tal como un amino dextrano o un carboxilo dextrano, tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 10 kDa a 500 kDa, o en otras realizaciones, tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 25 kDa a 150 kDa. En otra realización, un sbp marcado con quimioluminiscente incluye un polisacárido, tal como el amino dextrano o el carboxilo dextrano con un peso molecular promedio en el intervalo de 50-100 kDa. En otra realización más, un sbp marcado con quimioluminiscente incluye un polisacárido, tal como el amino dextrano o el carboxilo dextrano con un peso molecular promedio de 70 kDa.

En la mayoría de las realizaciones, el peso molecular promedio del sbp marcado con activador está dentro del intervalo inclusivo de 200 kDa a 3000 kDa. En algunas realizaciones, el peso molecular promedio del par de unión específica marcado con activador suele ser de 350 kDa a 1500 kDa.

Marcas de activador

El compuesto activador forma parte de un sbp marcado con activador, al que también puede mencionarse como conjugado de activador-compañero de unión específica. El sbp con marca de activador cumple una doble función: 1) ser sometido a una reacción de unión específica en proporción a la cantidad de analito en el ensayo a través de la porción de compañero de unión específica y 2) activar el compuesto quimioluminiscente en la porción de activador. La

porción de activador del sbp marcado con activador es un compuesto que provoca la activación del compuesto quimioluminiscente de manera que, ante la presencia de la solución activadora, se produce la quimioluminiscencia. Los compuestos capaces de servir como marca de activador son sales y complejos de metales de transición y enzimas, en especial enzimas que contienen un metal de transición, más especialmente las enzimas peroxidasa en donde la marca de activador tiene actividad peroxidasa. Los metales de transición útiles en los compuestos activadores incluyen los grupos 3-12 de la tabla periódica, en especial hierro, cobre, cobalto, zinc, manganeso, cromo y vanadio.

Las enzimas peroxidasa que pueden ser sometidas a la reacción de quimioluminiscencia incluyen, p. ej., lactoperoxidasa, microperoxidasa, mieloperoxidasa, haloperoxidasa, vanadio bromoperoxidasa, peroxidasa de rábano picante, peroxidases fúngicas, lignina peroxidasa, peroxidasa de *Arthromyces ramosus*, manganeso peroxidasa producida en hongos de podredumbre blanca, y peroxidasa de soya. Se tiene conocimiento de otros compuestos miméticos de peroxidasa que no son enzimas sino que poseen una actividad similar a la de la peroxidasa incluidos los complejos de hierro, tales como el hemo y Mn-TPPS4 (Y.-X. Ci, et al., Mikrochem. J., 52, 257-62 (1995)). Estos catalizan la oxidación quimioluminiscente de los sustratos y se los considera explícitamente dentro del alcance del significado de peroxidasa en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el sbp marcado con activador puede incluir conjugados o complejos de una peroxidasa y una molécula biológica en métodos para producir quimioluminiscencia, con la única condición de que el conjugado presente actividad de peroxidasa o similar a la peroxidasa. Las moléculas biológicas que pueden conjugarse en una o más moléculas de una peroxidasa incluye ADN, ARN, oligonucleótidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, quimeras anticuerpos-ADN, antígenos, haptenos, proteínas, péptidos, lectinas, avidina, estreptavidina y biotina. Los complejos que incluyen o incorporan una peroxidasa, tales como liposomas, micelas, vesículas y polímeros que están funcionalizados para unirse a moléculas biológicas, también pueden usarse en los métodos de la presente descripción.

Inhibidor selectivo de señal (SSIA)

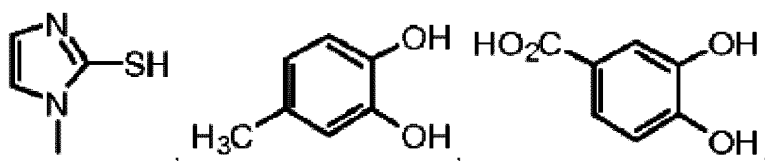
Los inhibidores selectivos de señal de la presente invención son compuestos que al ser incluidos en una mezcla de reacción de ensayo que comprende sbp marcado con quimioluminiscente libre y/o ligado a analito, sbp marcado con activador libre y/o ligado a analito, potenciador y una solución activadora, de manera tal que la señal resultante de los miembros sbp marcados ligados al analito supera la señal de fondo en un grado significativamente superior a lo que ocurre en ausencia del SSIA.

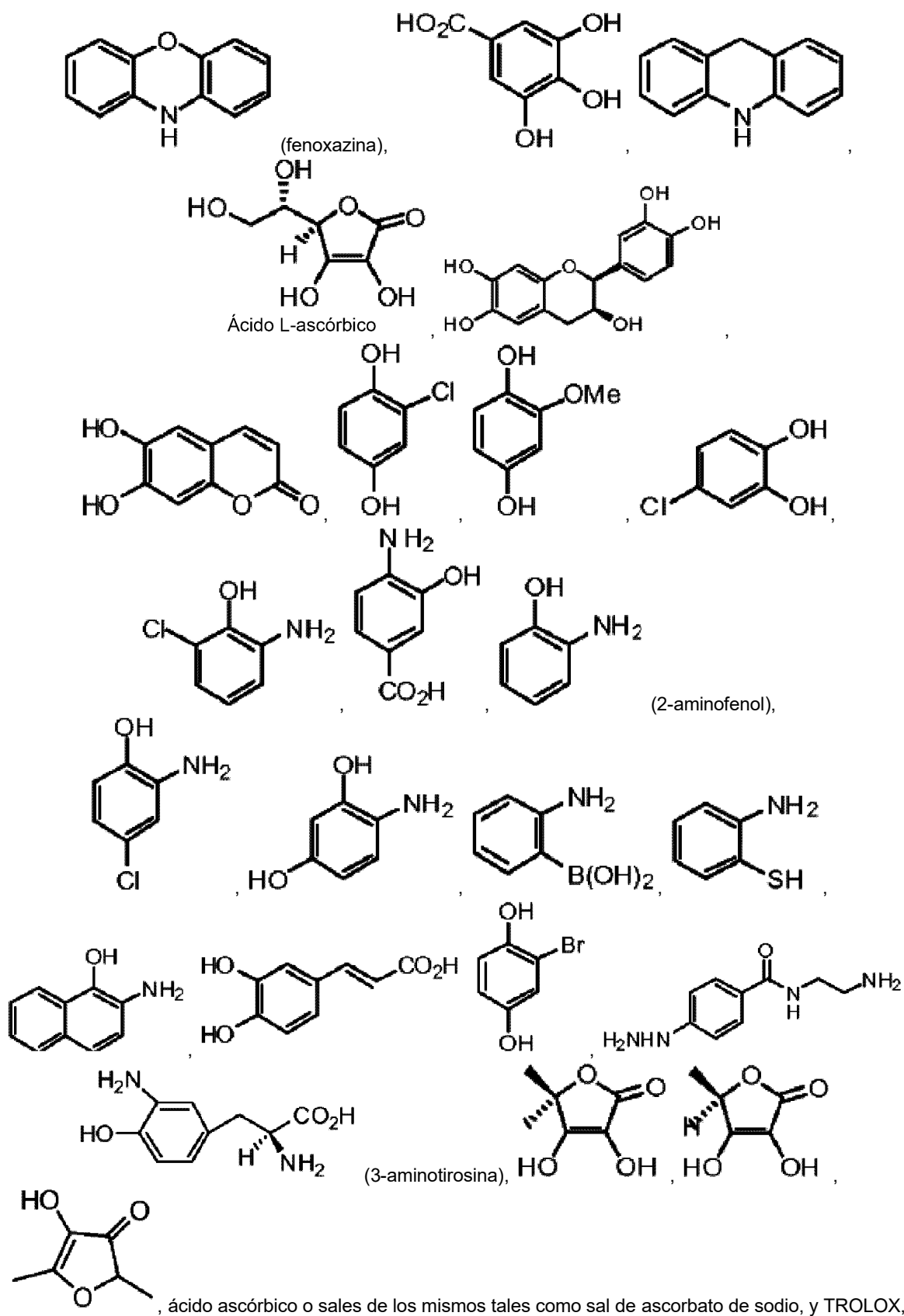
En los métodos de reacción con concentraciones entre 10^{-6} M y 10^{-1} M, frecuentemente entre 10^{-6} M y 10^{-2} M, a menudo entre 10^{-5} M y 0.3 M, algunas veces entre 10^{-5} M y 10^{-4} M hay presentes uno o más inhibidores selectivos de señal. En algunas realizaciones, hay un inhibidor selectivo de señal presente entre 5×10^{-6} M y 5×10^{-4} M en reacciones según los presentes métodos. En otras realizaciones, hay presente un inhibidor selectivo de señal entre 5×10^{-5} M y 5×10^{-4} M en reacciones según los presentes métodos.

El inhibidor selectivo de señal puede suministrarse como reactivo o solución aparte a una concentración superior a la pretendida en la solución de reacción. En esta realización, se dosifica una cantidad medida de solución de trabajo en la solución de reacción para lograr la concentración de reacción deseada. En otra realización, el inhibidor selectivo de señal se combina en una solución que contiene uno o más miembros sbp marcados. En otra realización, el inhibidor selectivo de señal se proporciona como componente de la solución activadora.

El grado en el cual el inhibidor selectivo de señal mejora la relación señal:fondo variará según la identidad del compuesto y la concentración a la cual se usa, entre otros factores. El grado puede formularse en términos de un factor de mejora en el cual la relación señal:fondo de un ensayo a una determinada concentración de analito en donde se realiza el ensayo con el inhibidor selectivo de señal se compara con la relación señal:fondo de un ensayo a la misma concentración del analito sin el inhibidor selectivo de señal. Un factor de mejora > 1 es una medida de un ensayo mejorado y es evidencia de un efecto beneficioso del inhibidor selectivo de señal. En realizaciones de la invención se logran factores de mejora de al menos 2, como de al menos 5 e incluso al menos 10 o al menos 50. Se verá en referencia a los ejemplos que aparecen a continuación, que los factores de mejora pueden variar dentro de un ensayo en función de la concentración de analito. Por ejemplo, los factores de mejora pueden aumentar si aumenta la concentración del analito. En otra realización la variación del factor de mejora en una concentración puede dar como resultado una curva de calibración más lineal, es decir, un gráfico de intensidad de la quimioluminiscencia en comparación a la concentración del analito.

La siguiente lista ofrece compuestos capaces de funcionar eficazmente como inhibidores selectivos de señal.





En diversas realizaciones, uno o más de los inhibidores selectivos de señal antes mencionados se usan en combinación con métodos de ensayo, ensayos o kits de la presente descripción.

En algunas realizaciones, los inhibidores selectivos de señal tienen solubilidad en solución acuosa con una concentración de 10 veces la solución de trabajo. La solución de trabajo se define como una solución acuosa concentrada, tal que una porción de la solución concentrada se agrega a la mezcla de reacción para lograr la concentración final necesaria después de agregar la solución activadora.

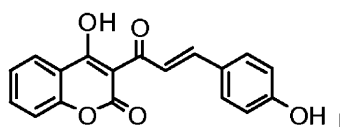
Las soluciones acuosas adecuadas para soluciones de trabajo del inhibidor selectivo de señal incluyen uno o más de los siguientes componentes adicionales: sales, tampones biológicos, dimetil sulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), alcoholes, incluidos etanol, metanol, glicoles y detergentes. En algunas realizaciones, las soluciones acuosas incluyen soluciones acuosas tamponadas con Tris, 25 % etanol/75 % solución acuosa tamponada con Tris, 25 % etanol/75 % Triton-X-100 (1 %) acuoso, 10 % 0,1 N NaOH/ 90 % solución acuosa tamponada con Tris. Un ejemplo de solución acuosa tamponada con Tris está compuesto por solución salina tamponada con TRIS, surfactante, <0,1 % azida de sodio y 0,1 % ProClin® 300 (Rohm and Haas)), mencionado aquí como Tampón II y que está disponible comercialmente en Beckman Coulter, Inc., Brea CA.

Soluciones activadoras y potenciadores

La solución activadora ofrece un reactivo necesario para generar el compuesto en estado excitado necesario para la quimioluminiscencia. El reactivo puede ser uno necesario para realizar la reacción de quimioluminiscencia mediante reacción directa con la marca quimioluminiscente. Puede ser usado en lugar de esta función, o además de ella, para facilitar la acción del compuesto activador. Este será el caso, por ejemplo, cuando el activador sea una enzima peroxidasa. La solución activadora comprende un compuesto peróxido. El componente peróxido es cualquier peróxido o de alquilo capaz de reaccionar con la peroxidasa. Entre los ejemplos de peróxidos están el peróxido de hidrógeno, el peróxido de urea y las sales perborato. La concentración de peróxido usada en la solución activadora puede variar dentro de un intervalo de valores, de forma típica de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 3 M, más comúnmente de aproximadamente 10^{-3} M a aproximadamente 10^{-1} M. En otra realización, la solución activadora comprende peróxido y un compuesto potenciador que promueve la recuperación catalítica de un activador que tiene actividad peroxidasa.

Una realización representativa usa un conjugado de peroxidasa como activador, un compañero de unión específica marcado con acridán de un analito en donde la marca de acridán se proporciona haciendo reaccionar al compañero de unión específica con un compuesto marcador de acridán como se describe más adelante, y una solución activadora que comprende peróxido de hidrógeno. El peróxido reacciona con la peroxidasa, presumiblemente para cambiar el estado de oxidación del hierro en el sitio activo de la enzima a un estado de oxidación diferente. Este estado alterado de la enzima reacciona con una molécula potenciadora para promover la recuperación catalítica de la enzima. Una especie de reactivo formado a partir del potenciador o de la enzima reacciona con la marca de acridán mantenida a corta distancia de la enzima. La reacción quimioluminiscente comprende otra reacción de un intermedio formado a partir del compuesto quimioluminiscente con el peróxido para generar el producto de reacción y luz.

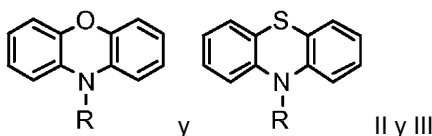
La incorporación de ciertos compuestos potenciadores en la solución activadora promueve la reactividad de la enzima o reduce la señal de fondo o cumple ambas funciones. Entre estos potenciadores se incluyen los compuestos fenólicos y las aminas aromáticas, que se sabe que mejoran las reacciones de peroxidasa. Es posible usar mezclas de un compuesto de fenoxazina o fenotiazina con un compuesto de indofenol o indoanilina tal como se indica en la patente US-5.171.668 como potenciador en la presente invención. También es posible usar hidroxibenzoxazoles sustituidos, 2-hidroxi-9-fluorenona y compuesto I,



como se describe en la patente US-5.206.149 como potenciador en la presente invención. Asimismo, los compuestos de ácido arilborónico sustituido y sin sustituir y sus ésteres y derivados anhidros divulgados en la patente US- 5.512.451 también se consideran dentro del alcance de los potenciadores útiles en la presente descripción. Los potenciadores fenólicos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa: p-fenilfenol, p-yodofenol, p-bromofenol, ácido p-hidroxi cinámico, p-imidazolilfenol, acetaminofén, 2,4-diclorofenol, 2-naftol y 6-bromo-2-naftol.

También pueden usarse mezclas de más de un potenciador de las clases antes mencionadas.

Los potenciadores adicionales que son útiles en la práctica de la presente invención son derivados, incluyen compuestos de hidroxibenzotiazol y compuestos de fenoxazina y fenotiazina de las fórmulas II y III que aparece a continuación.



Los grupos R sustituidos en el átomo de nitrógeno de los potenciadores fenoxazina y fenotiazina incluyen alquilos de 1 a 8 átomos de carbono, y alquilos de 1 a 8 átomos de carbono sustituidos con grupo de sal de sulfonato o sal de carboxilato. Entre los ejemplos de potenciadores se encuentran las sales de ácido 3-(N-fenotiazinil)-propanosulfónico, sales de ácido 3-(N-fenoxazinil) propanosulfónico, sales de ácido 4-(N-fenoxiazinil) ácido butanosulfónico, sales de ácido 5-(N-fenoxazinil) pentanoico y N-metilfenoxazina y homólogos relacionados. La concentración de potenciadores usada en la solución activadora puede variar dentro de un intervalo de valores, de forma típica de aproximadamente 10^{-5} M a aproximadamente 10^{-1} M, más comúnmente de aproximadamente 10^{-4} M a aproximadamente 10^{-2} M.

La reacción de detección de la presente descripción se realiza con una solución activadora que suele ser un tampón acuoso. Entre los tampones adecuados están todos los tampones usados comúnmente capaces de mantener un entorno que permita que ocurra la reacción de quimioluminiscencia. Típicamente, la solución activadora tendrá un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10,5. Tampones ilustrativos incluyen fosfato, borato, acetato, carbonato, tris(hidroximetilamino)metano[tris], glicina, tricina, 2-amino-2-metil-1-propanol, dietanolamina, MOPS, HEPES, MES y similares.

La solución activadora también puede contener uno o más detergentes o surfactantes poliméricos para mejorar la eficiencia de la luminiscencia de la reacción generadora de luz o mejorar la relación señal/ruido del ensayo. Los surfactantes no iónicos útiles en la práctica de la presente descripción incluyen, a modo de ejemplo, alquifenoles polioxietilenados, alcoholes polioxietilenados, éteres polioxietilenados y ésteres de sorbitol polioxietilenados. Pueden usarse surfactantes catiónicos monoméricos, incluidos los compuestos de sales de amonio cuaternario tales como CTAB y compuestos de sal de fosonio cuaternario. Los surfactantes catiónicos poliméricos incluidos aquellos que comprenden los grupos de sales de amonio cuaternario y fosonio también pueden usarse con este fin.

En una realización, la solución activadora es una realización que comprende un tampón acuoso, un peróxido a una concentración de aproximadamente 10^{-5} M a aproximadamente 1 M, y un potenciador a una concentración de aproximadamente 10^{-5} M a aproximadamente 10^{-1} M. La composición puede contener opcionalmente aditivos entre los que se incluyen surfactantes, agentes quelantes para metal y conservantes para evitar o minimizar la contaminación microbiana. El pH de la solución activadora suele estar entre pH 6,0 y pH 9,0. En algunas realizaciones, el pH es de pH 6,5 a pH 8,5, en otras realizaciones el pH está en el intervalo de pH 7,0-8,0.

Pares de unión específica

Un miembro de un par de unión específica o compañero de unión específica (sbp) se define en la presente memoria como una molécula, incluidas las moléculas biológicas, que tiene afinidad de unión específica con otra sustancia. Un miembro de un par de unión específica incluye ADN, ARN, oligonucleótidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, quimeras ADN-anticuerpos, antígenos, haptenos, proteínas, péptidos, lectinas, avidina, estreptavidina y biotina. Cada miembro de un par de unión específica de un par específico tiene una afinidad de unión específica con la misma sustancia (p. ej., analito). Cada miembro de un par de unión específica es no idéntico al otro miembro de un par de unión específica en un par de unión específica al menos en que los miembros de un par de unión específica no deben competir por el mismo sitio de unión, o uno que se superponga en un analito. Por ejemplo, si un par de unión específica está compuesto por dos anticuerpos, cada anticuerpo sbp tiene un epítipo diferente no competidor en el analito.

Las sustancias de unión específica incluyen, a modo de ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, antígenos, haptenos y sus anticuerpos cognados, biotina y avidina o estreptavidina, proteína A e IgG, ácidos nucleicos complementarios o oligonucleótidos, lectinas y carbohidratos.

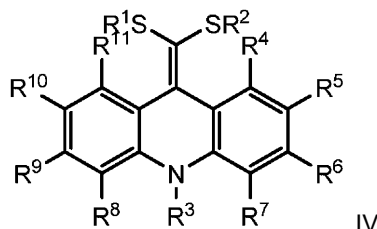
Además de los pares antígeno-anticuerpo, hapteno-anticuerpo o anticuerpo-anticuerpo antes mencionados, los pares de unión específica también pueden incluir oligonucleótidos o polinucleótidos complementarios, avidina-biotina, estreptavidina-biotina, hormona-receptor, lectina-carohidrato, IgG, proteína A, proteína de unión-receptor, ácido nucleico-proteína de unión ácido nucleico y ácido nucleico-anticuerpo ácido nucleico. Los ensayos con receptores usados para analizar candidatos a drogas son otra área de uso para los métodos presentes. Cualquiera de estos pares de unión puede ser adaptado para usarse en los métodos presentes con la técnica del sándwich de tres componentes o la técnica competitiva de dos componentes anteriormente descrita.

Compuestos quimioluminiscentes

Los compuestos usados como marcas quimioluminiscentes en la práctica de la presente descripción tienen la fórmula general CL-L-RG, en donde CL es una fracción quimioluminiscente, L indica una fracción de unión para unir la fracción quimioluminiscente y un grupo reactivo, y RG indica una fracción de grupo reactivo para acoplamiento con otro material. El uso de los términos “grupo quimioluminiscente” y “fracción quimioluminiscente” es intercambiable, al igual que el de los términos “fracción de unión” y “grupo de unión”. La fracción quimioluminiscente CL comprende un compuesto que es sometido a una reacción con un activador, que resulta en su conversión en un compuesto activado. La reacción de un compuesto activado con una solución activadora forma un compuesto en estado excitado electrónicamente. El estado excitado puede ser singlete o triplete. El estado excitado puede emitir luz directamente al relajarse al estado fundamental o puede transferir

energía de excitación a un aceptor de energía emisivo, volviendo así al estado fundamental. El aceptor de energía se eleva a un estado excitado en el proceso y emite luz. Es preferible, aunque no necesario, que la reacción de quimioluminiscencia del grupo CL, el activador y la solución activadora sea rápida, que suceda en el tiempo más breve posible; en una realización en la que se llega al pico de intensidad en unos pocos segundos.

En una realización, un grupo de compuestos con marca quimioluminiscente que comprende un acridán cetenditioacetal (AK) útil en los métodos de la descripción comprende compuestos de acridán con la fórmula IV,



en donde al menos uno de los grupos R^1 - R^{11} es un sustituyente marcador de la fórmula -L-RG en donde L es un grupo de enlace que puede ser una unión u otro grupo divalente o polivalente, RG es un grupo reactivo que permite que el compuesto marcador quimioluminiscente se una a otro compuesto, R^1 , R^2 y R^3 son grupos orgánicos que contienen de 1 a 50 átomos distintos del hidrógeno, y cada uno de R^4 - R^{11} es hidrógeno o un sustituyente no interferente. El sustituyente marcador -L-RG puede estar presente en uno de R^1 o R^2 aunque también puede estar presente como sustituyente en R^3 o uno de R^4 - R^{11} .

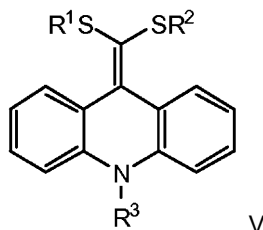
Los grupos R^1 y R^2 en el compuesto de la fórmula IV pueden ser cualquier grupo orgánico que contenga de 1 a aproximadamente 50 átomos de no hidrógeno seleccionados de C, N, O, S, P, Si y átomos halógenos que permiten la producción de luz. Lo último significa que cuando un compuesto de la fórmula 1 es sometido a una de las reacciones en la presente descripción, se produce un compuesto en estado excitado y puede involucrar la producción de uno o más intermedios quimioluminiscentes. El producto en estado excitado puede emitir luz directamente o puede transferir la energía de la excitación a un aceptor fluorescente a través de transferencia de energía haciendo que se emita luz desde el aceptor fluorescente. En una realización, R^1 y R^2 se seleccionan de los grupos alquilo sustituido y no sustituido, alquienilo sustituido o no sustituido, alquiniilo sustituido y no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y aralquilo sustituido o no sustituido de 1 a 20 átomos de carbono. Cuando R^1 o R^2 es un grupo sustituido, puede ser sustituido con grupos 1-3 seleccionados de los grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(C_1 - C_8 alquil)silil, un grupo SO_3^- , un grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosil, un grupo PO_3^- , un grupo OPO_3^{2-} , átomos halógenos, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, grupos amino, grupos amonio cuaternario y grupos fosfonio cuaternario. En una realización, R^1 o R^2 es sustituido con el sustituyente marcador de la fórmula -L-RG en donde L es un grupo de enlace y RG es un grupo reactivo.

El grupo R^3 es un grupo orgánico que contiene de 1 a 50 átomos distintos del hidrógeno seleccionados de C, N, O, S, P, Si y halógeno además de la cantidad necesaria de átomos de H necesarios para satisfacer las valencias de los átomos en el grupo. En una realización, R^3 contiene de 1 a 20 átomos distintos del hidrógeno. En otra realización, el grupo orgánico se selecciona del grupo que consiste en grupos alquilo, alquilo sustituido, alquienilo sustituido o no sustituido, alquiniilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y aralquilo sustituido o no sustituido de 1 a 20 átomos de carbono. En otra realización, los grupos para R^3 incluyen grupos alquilo C_1 - C_4 sustituido o no sustituido, fenilo, grupos bencilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxialquilo, carboxialquilo y de ácido alquilsulfónico. Cuando R^3 es un grupo sustituido, puede ser sustituido con grupos 1-3 seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(C_1 - C_8 alquil)silil, un grupo SO_3^- , un grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosil, un grupo PO_3^- , un grupo OPO_3^{2-} , átomos halógenos, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, grupos amino, grupos amonio cuaternario y grupos fosfonio cuaternario. El grupo R^3 puede unirse a R^7 o R^8 para completar un anillo de 5 o 6 miembros. En una realización, R^3 es sustituido con el sustituyente marcador de la fórmula -L-RG.

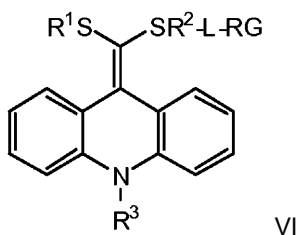
En los compuestos de la fórmula IV, los grupos R^4 - R^{11} se seleccionan cada uno independientemente de H o un grupo sustituyente que permite la producción del producto en estado excitado y generalmente contiene de 1 a 50 átomos seleccionados de C, N, O, S, P, Si y halógenos. Los grupos sustituyentes representativos que pueden estar presentes, incluyen, sin limitación, grupos alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, alquienilo, alquiniilo, alcoxi, ariloxi, halógeno, amino, amino sustituido, carboxilo, carboalcoxi, carboxamida, ciano y sulfonato. Es posible unir partes de grupos adyacentes, p. ej., R^4 - R^8 o R^8 - R^6 , para formar un sistema de anillos carbocíclico o heterocíclico que comprenda al menos un anillo de 5 o 6 miembros fusionado con el anillo al cual están unidos los dos grupos. Estos anillos heterocíclicos fusionados pueden contener átomos de N, O o S y pueden contener sustituyentes de anillos diferentes del H tales como los mencionados anteriormente. Uno o más de los grupos R^4 - R^{11} puede ser un sustituyente marcador de la fórmula -L-RG. En una realización, R^4 - R^{11} se seleccionan de hidrógeno, halógeno y grupos alcoxi tales como metoxi, etoxi, t-butoxi y similares. En otra realización, un grupo de compuestos tiene uno de R^8 , R^6 , R^9 o R^{10} como un halógeno y el otro de R^4 - R^{11} son átomos de hidrógeno.

Los grupos sustituyentes pueden incorporarse en diversas cantidades y en posiciones seleccionadas en el anillo o la cadena en el anillo acridán con el fin de modificar las propiedades del compuesto o para conveniencia de la síntesis. Estas propiedades incluyen, p. ej., el rendimiento cuántico de la quimioluminiscencia, la tasa de reacción con la enzima, la máxima intensidad lumínica, la duración de la emisión de luz, la longitud de onda de la emisión de luz y la solubilidad en el medio de reacción. Los sustituyentes específicos y sus efectos se ilustran en los ejemplos específicos que se dan a continuación, sin embargo, no deben considerarse limitativos del alcance de la descripción bajo ningún punto de vista. Por conveniencia sintética, es conveniente que los compuestos de la fórmula I tengan cada uno de R^4 a R^{11} como átomo de hidrógeno.

- 10 En otra realización, un grupo de compuestos tiene fórmula V en donde cada uno de R^4 a R^{11} es hidrógeno. Los grupos R^1 , R^2 y R^3 son tal como se definieron anteriormente.



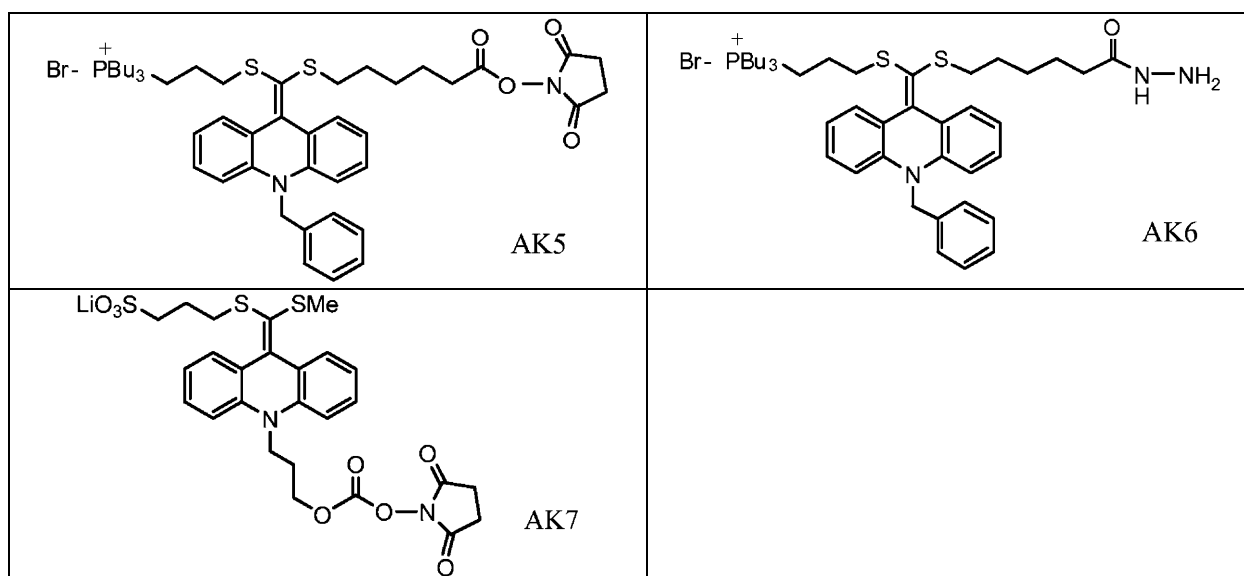
- 15 Los compuestos marcadores de las fórmulas IV o V tienen los grupos -L-RG como un sustituyente en el grupo R^1 o R^2 . En una realización, un compuesto marcador tiene la fórmula VI.



- 20 Los compuestos marcadores representativos tienen las estructuras que se indican a continuación. En los ejemplos específicos que aparecen a continuación se describen más ejemplos de compuestos y su uso unidos a otras moléculas y superficies sólidas. Las estructuras que se muestra más adelante ilustran ejemplos de compuestos de la fórmula CL-L-RG.

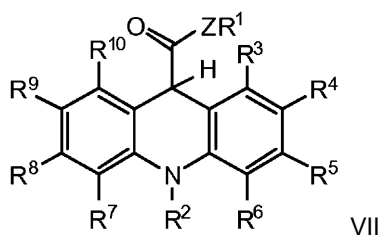
Tabla 8

AK1	AK2
AK3	AK4



Los compuestos AK específicos antes mencionados y los compuestos de fórmulas generales IV, V y VI mostrados anteriormente pueden ser preparados por un químico orgánico calificado que use métodos generalmente aceptados, incluidos los métodos descritos en la aplicación publicada US-2007/0172878. En un método ilustrativo, se hace reaccionar un compuesto de anillo de acridán N-sustituido y opcionalmente con anillo sustituido con una base fuerte seguido de CS₂ para formar un acridán ditiocarboxilato. El ditiocarboxilato se esteriza mediante métodos convencionales para instalar uno de los sustituyentes designado R¹. El ditióéster acridán resultante se desprotoniza nuevamente con una base fuerte tal como n-BuLi o NaH en un solvente aprótico y es S-alquilado con un reactivo adecuado que contenga un grupo saliente y una fracción R². Resultará de inmediato evidente para una persona calificada en química orgánica que la fracción R² puede verse sujeta a más manipulación para instalar los grupos reactivos adecuados.

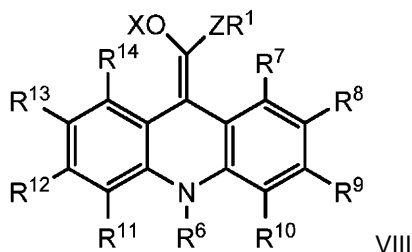
Otra clase de fracciones quimioluminiscentes incluye los ésteres de acridán, tioésteres y sulfonamidas descritas en la patente US-5.491.072; US-5.523.212; US-5.593.845; y US-6.030.803. Los compuestos marcadores quimioluminiscentes en esta clase tiene una fracción quimioluminiscente CL de la fórmula VII que se indica más adelante en donde Z es O, S o NR¹¹SO₂Ar, en donde R¹¹ es alquilo o arilo, en donde Ar es arilo o arilo sustituido por alquilo, en donde R¹ es alquilo C₁₋₈, alquilo C₁₋₈ sustituido por halo, alquilo, aralquilo o arilo sustituido por grupos alquilo, alquenoilo, alquinoilo, aralquilo, arilo, alcoxi, alcóxialquilo, halógeno, carbonilo, carboxilo, carboxamida, ciano, trifluorometilo, trialquiloamonio, nitro, hidroxilo, amino y mercapto, en donde R² se selecciona de los grupos alquilo, heteroalquilo, arilo y aralquilo, y en donde los R³⁻¹⁰ son cada uno hidrógeno o se seleccionan 1 o 2 sustituyentes de alquilo, alcoxi, hidroxilo y halógeno y los R³⁻¹⁰ restantes son hidrógeno. En una realización cada uno de los R³⁻¹⁰ es hidrógeno y R¹ es un sustituyente marcador. En otra realización, uno de R³⁻¹⁰ es un sustituyente marcador y los otros de R³⁻¹⁰ son hidrógeno.



Otra clase de fracciones quimioluminiscentes incluye los compuestos heterocíclicos descritos en la patente US-5.922.558; US-6.696.569; y US-6.891.057. En una realización, los compuestos comprenden un anillo heterocíclico, que comprende un anillo de cinco o seis miembros que contiene nitrógeno, oxígeno o azufre o un grupo de anillo múltiple al que hay unido una unión doble exocíclica, cuyo carbono terminal está sustituido por dos átomos seleccionados de átomos de oxígeno y azufre.

En otra realización, los compuestos marcadores quimioluminiscentes comprenden un derivado enol acridán quimioluminiscente de la fórmula VIII que se indica más adelante en donde R¹ se selecciona de grupos alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo y aralquilo de 1-20 átomos de carbono, cualquiera de los cuales puede ser sustituido con grupos 1-3 seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(C₁-C₈ alquil)silil, un grupo SO₃⁻, un grupo OSO₃⁻², grupos glicosil, un grupo PO₃⁻, un grupo OPO₃⁻², átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, grupos amino, grupos de amonio cuaternario o grupos de fosfonio cuaternario, en donde X se selecciona de grupos alquilo, arilo, aralquilo C₁-C₈, teniendo los grupos alquilo o arilo carboxilo de 1-20 átomos de carbono, grupos tri(C₁-C₈

alquil)silil, un grupo SO_3^- , grupos glicosil y grupos fosforil de la fórmula $\text{PO}(\text{OR}')(\text{OR}'')$ en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de los grupos alquilo, cianoalquilo, arilo y aralquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, grupos trialquilsilil, cationes de metales alcalinos, cationes alcalino-térreos, cationes de amonio y trialquilsfosfonio, en donde Z se selecciona de átomos de O y S , en donde R^6 se selecciona de grupos alquilo, fenilo, benzilo, alcoxialquilo y carboxialquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ sustituidos y no sustituidos, en donde R^{7-14} son cada hidrógeno o se seleccionan 1 o 2 sustituyentes de alquilo, alcoxi, hidroxi y halógeno y el resto de R^{7-14} son hidrógeno. En una realización cada uno de los R^{7-14} es hidrógeno y R^1 es un sustituyente marcador. En otra realización, uno de R^{7-14} es un sustituyente marcador y los otros de R^{7-14} son hidrógeno.



Grupo de unión (L). El grupo de unión en cualquier compuesto quimioluminiscente usado en la presente descripción puede ser una unión, un átomo, grupos divalentes y grupos polivalentes, o una cadena recta o ramificada de átomos, algunos de los cuales pueden ser parte de la estructura de un anillo. El sustituyente suele contener de 1 a aproximadamente 50 átomos distintos del hidrógeno, más frecuentemente de 1 a aproximadamente 30 átomos distintos del hidrógeno. En otra realización, los átomos que comprenden la cadena se seleccionan de átomos de C , O , N , S , P , Si , B y Se . En otra realización, los átomos que comprenden la cadena se seleccionan de átomos de C , O , N , P y S . La cantidad de átomos distintos del carbono en la cadena normalmente es de 1 a 10. Puede haber presentes átomos de halógeno como sustituyentes en la cadena o anillo. Los grupos funcionales típicos que comprenden el sustituyente de unión incluyen los grupos alquilenos, arilenos, alquilenos, éter, peróxido, carbonilo como una cetona, éster, de carbonato, tioéster, o grupo amida, amina, amidina, carbamato, urea, imina, imida, imidato, carbodiimida, hidrazino, diazo, fosfodiéster, fosfotriéster, éster de fosfonato, tioéter, disulfuro, sulfóxido, sulfona, éster de sulfonato y grupo de tiourea. En otra realización, el grupo es una cadena de alquilenos de 1-20 átomos que termina en un grupo $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{NR}-$, $-\text{SiO}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{SC}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$, $-\text{NRC}(=\text{O})-$, $-\text{NRC}(=\text{S})-$, o $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}-$, en donde R es alquilo C_{1-8} . En otra realización, el grupo de unión es una cadena de poli(alquilen-oxi) de 3-30 átomos que termina en un grupo $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{NR}-$, $-\text{SiO}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{SC}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$, $-\text{NRC}(=\text{O})-$, $-\text{NRC}(=\text{S})-$, o $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}-$, en donde R es alquilo C_{1-8} .

Grupo reactivo. El grupo reactivo RG es un átomo o grupo cuya presencia facilita la unión a otra molécula por unión covalente o fuerzas físicas. En algunas realizaciones, el acoplamiento de un compuesto marcador quimioluminiscente de la presente descripción a otro compuesto o sustancia implicará la pérdida de uno o más átomos del grupo reactivo, por ejemplo cuando el grupo reactivo es un grupo saliente tal como un átomo de halógeno o un grupo tosilato y el compuesto marcador quimioluminiscente está unido covalentemente a otro compuesto mediante una reacción de desplazamiento nucleofílico.

En una realización, el RG es un grupo de éster N-hidroxisuccinimida (NHS). El experto entenderá de inmediato que una sustancia que se desea marcar con un compuesto marcador de este tipo que comprende un grupo éster NHS reaccionará con una fracción en la sustancia, generalmente un grupo amino, en el proceso separando la unión éster C-O , liberando N-hidroxisuccinimida y formando una nueva unión entre un átomo de la sustancia (N si es un grupo amino) y el carbono de carbonilo del compuesto marcador. En otra realización, RG es una fracción de hidrazina, $-\text{NHNH}_2$. Como es sabido en la técnica, este grupo reacciona con un grupo carbonilo en una sustancia para ser marcado para formar un enlace de hidrazida.

En otras realizaciones, la unión de un compuesto marcador quimioluminiscente a otro compuesto por formación de enlace covalente involucrará la reorganización de los enlaces dentro de grupo reactivo, como ocurre en una reacción de adición tal como una adición de Michael o cuando el grupo reactivo es un grupo isocianato o isotiocianato. En otras realizaciones, la unión no involucrará la formación de enlaces covalentes sino fuerzas físicas en cuyo caso el grupo reactivo permanece inalterado. Las fuerzas físicas son fuerzas de atracción tales como el enlace de hidrógeno, la atracción electrostática o iónica, la atracción hidrofóbica tal como el apilamiento de bases, y las interacciones de afinidad específicas tales como las interacciones biotina-estratégicamente, antígeno-anticuerpo y nucleofílico-nucleótido.

Los grupos reactivos para unión química de marcas a moléculas orgánicas y biológicas incluyen, a modo de ejemplo: a) Grupos amino reactivos: $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$, $-\text{SO}_2\text{Cl}$, $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$, $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$; b) Grupos tiol reactivos: $-\text{S-S-R}$; c) Grupos ácido carboxílico reactivos: $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NHNH}_2$; d) Grupos hidroxilo reactivos: $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$, $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$, $-\text{SO}_2\text{Cl}$, $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$; e) Grupos aldehído/acetona reactivos: $-\text{NH}_2$, $-\text{ONH}_2$, $-\text{NHNH}_2$; y f) Otros grupos reactivos p. ej., R-N_3 , $\text{R-C}=\text{CH}$.

En una realización, los grupos reactivos incluyen OH , NH_2 , ONH_2 , NHNH_2 , COOH , $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$, éster N-hidroxisuccinimida, éter N-hidroxisuccinimida y grupos maleimida.

Los reactivos de acoplamiento bifuncionales también pueden usarse para acoplar marcas a moléculas orgánicas y biológicas con grupos moderadamente reactivos (ver L. J. Kricka, *Ligand-Binder Assays*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1985, pp. 18-20, Tabla 2.2 y T. H. Ji, "Bifunctional Reagents," *Methods in Enzymology*, 91, 580-609 (1983)). Hay dos tipos de reactivos bifuncionales: los que se incorporan a la estructura final y los que no lo hacen y solo sirven para acoplar los dos reactivos.

Soluciones acuosas

Las soluciones acuosas adecuadas para usar en la presente descripción son generalmente soluciones que contienen más de un 50 % de agua. Las soluciones acuosas descritas en la presente memoria son adecuadas para usos que incluyen mezcla de reacción, dilución de muestra, soluciones calibradoras, soluciones sbp marcado con quimioluminiscente, soluciones de sbp marcado con activador, soluciones potenciadoras, y solución activadora, o soluciones concentradas de uno o más de los siguientes: sbp marcado con quimioluminiscente, sbp marcado con activador, potenciador, disparador, muestra, y/o inhibidores selectivos de señal. En muchas realizaciones, las soluciones acuosas son soluciones tamponadoras acuosas. Los tampones acuosos solubles incluyen cualquiera de los tampones habitualmente utilizados capaces de mantener un entorno en solución acuosa que mantenga la solubilidad de los analitos, mantenga la solubilidad de los reactivos, y permita que ocurra la reacción de quimioluminiscencia. Tampones ilustrativos incluyen fosfato, borato, acetato, carbonato, tris(hidroxi-metilamino)metano (tris), glicina, tricina, 2-amino-2-metil-1-propanol, dietanolamina MOPS, HEPES, MES y similares. Típicamente, las soluciones acuosas para usar según la presente descripción tendrán un pH en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10,5.

Soluciones acuosas adecuadas pueden incluir uno o más de los siguientes componentes adicionales: sales, tampones biológicos, alcoholes, incluidos etanol, metanol, glicoles, y detergentes. En algunas realizaciones, las soluciones acuosas incluyen soluciones acuosas tamponadas con Tris, tales como Tampón II (solución salina tamponada con TRIS, tensioactivo, azida de sodio <0,1 %, y ProClin ® 300 al 0,1 % (Rohm and Haas) comercializada por Beckman Coulter, Inc., Brea CA,).

En algunas realizaciones, se utiliza una solución acuosa que reproduce el suero humano. Una de dichas matrices sintéticas es PBS 20 mM, BSA 7 %, pH 7,5 con ProClin® 300 al 0,1 %. Las matrices sintéticas se pueden utilizar para, aunque no de forma limitativa, dilución de muestra, soluciones calibradoras, soluciones de sbp marcado con quimioluminiscente, soluciones de sbp marcado con activador, soluciones potenciadoras, y soluciones activadoras. El término "PBS" significa, en el sentido habitual, solución salina tamponada con fosfato, como es conocida en la técnica. El término "BSA" significa, en el sentido habitual, albumina de suero bovino, como es conocida en la técnica.

Formatos de ensayo

Los formatos de ensayo requieren una acción de unión específica para mediar la proximidad entre la marca quimioluminiscente del sbp marcado con quimioluminiscente y la marca de activador del sbp marcado con activador.

En otra realización se utiliza un análogo del analito que comprende un conjugado activador-análogo del analito. En otra realización se utiliza un analito marcado que comprende un conjugado activador-análogo del analito. El conjugado activador-análogo del analito o el conjugado activador-analito y el analito se unirán de forma competitiva con el compañero de unión específica para el analito. Resultará evidente que en este tipo de método de ensayo habrá una correlación negativa entre la cantidad de analito en la muestra y la intensidad de la quimioluminiscencia.

Además de la unión de la marca quimioluminiscente mediante anticuerpos para la unión de antígenos u otras proteínas u otros anticuerpos mediante inmunoensayo, los métodos de la presente invención pueden utilizar ácidos nucleicos marcados con quimioluminiscente para detectar ácidos nucleicos mediante la unión de ácidos nucleicos complementarios. El uso en este sentido no está especialmente limitado con respecto al tamaño del ácido nucleico, siendo el único criterio que los pares complementarios tengan suficiente longitud para permitir una hibridación estable. Los ácidos nucleicos utilizados en la presente invención incluyen ácidos nucleicos de longitud génica, fragmentos más cortos de ácidos nucleicos, polinucleótidos y oligonucleótidos, cualquiera de los cuales puede ser monocatenarios o bicatenarios. En la práctica de la descripción que utiliza ácidos nucleicos como compañeros de unión específica, un ácido nucleico se une covalentemente o se inmoviliza físicamente sobre una superficie de un soporte sólido para capturar un ácido nucleico analito. La marca quimioluminiscente se puede unir al ácido nucleico de captura, o la marcarse puede conectar con una sustancia auxiliar, también unida al ácido nucleico de captura como se ha explicado anteriormente en la presente memoria. El ácido nucleico de captura será complementario de forma completa o sustancialmente completa a una región de secuencia del ácido nucleico analito. Cuando sea esencialmente complementario, el ácido nucleico de captura puede poseer una parte saliente terminal, una parte de bucle terminal o una parte de bucle interna que no sea complementaria al analito, siempre y cuando no interfiera con la hibridación con el analito o la impida. Se puede producir también la situación inversa en la que el saliente o bucle se halle dentro del ácido nucleico analito. Se deja que el ácido nucleico de captura, el ácido nucleico analito, un conjugado de un activador, y un tercer ácido nucleico hibriden. El tercer ácido nucleico es sustancialmente complementario a una región de secuencia del ácido nucleico analito diferente de la región complementaria al ácido nucleico de captura. La hibridación del ácido nucleico de captura y del ácido nucleico conjugado activador con el analito se puede llevar a cabo de forma consecutiva en cualquier orden o de forma simultánea. Como resultado de este proceso, la marca quimioluminiscente se lleva a una configuración reactiva con el activador mediante

reacciones de hibridación específicas que ponen el activador cerca de la marca quimioluminiscente unido a la superficie del soporte. Se proporciona la solución activadora y la quimioluminiscencia se detecta del modo arriba descrito.

Otra realización comprende una variación en donde se utiliza un conjugado del analito con el activador. El conjugado ácido nucleico analito-activador y el ácido nucleico analito se unirán de forma competitiva al compañero de unión específica para el ácido nucleico analito. Resultará evidente que en este tipo de método de ensayo habrá una correlación negativa entre la cantidad de analito en la muestra y la intensidad de la quimioluminiscencia.

Para los métodos de ensayo según la presente descripción, pueden servir como base, además de los sistemas basados en anticuerpo y basados en ácido nucleico, otros pares de unión específica conocidos generalmente por el experto en la técnica de ensayos de unión. También se pueden utilizar pares anticuerpo-hapteno. Son ilustrativos los pares fluoresceína/antifluoresceína, digoxigenina/antidigoxigenina, y nitrofenilo/antinitrofenilo.

Detección

La luz emitida mediante el presente método se puede detectar mediante cualquier método conocido adecuado tal como un luminómetro, una película de rayos X, una película fotográfica de alta velocidad, una cámara CCD, un contador de centelleo, un actinómetro químico o de forma visual. Cada medio de detección tiene una sensibilidad espectral diferente. El ojo humano tiene una sensibilidad óptima a la luz verde, las cámaras CCD muestran una sensibilidad máxima a la luz roja, se encuentran disponibles películas de rayos X con máxima respuesta tanto a la luz UV como a la luz azul o a la luz verde. La elección del dispositivo de detección vendrá gobernada por la aplicación y por consideraciones relativas al coste, comodidad de uso, y si se requiere la creación de un registro permanente. En las realizaciones en las que el transcurso de la emisión de luz es rápido, es ventajoso llevar a cabo la reacción activadora para producir la quimioluminiscencia en presencia del dispositivo de detección. Por ejemplo, la reacción de detección se puede llevar a cabo en un tubo de ensayo o en una microplaca alojada en un luminómetro o colocada delante de una cámara CCD en un alojamiento adaptado para recibir tubos de ensayo o placas de micropocillos.

Usos

Los presentes métodos de ensayo son aplicables en muchos tipos de ensayos de pares de unión específica. Entre dichos métodos se encuentran principalmente los inmunoensayos ligados a enzimas quimioluminiscentes, tales como una ELISA. En la técnica se conocen bien diversos formatos de ensayo y los protocolos para llevar a cabo las etapas inmunoquímicas e incluyen tanto ensayos competitivos como ensayos de sándwich. Tipos de sustancias que se pueden analizar mediante inmunoensayo según la presente descripción incluyen proteínas, péptidos, anticuerpos, haptenos, medicamentos, esteroides y otras sustancias que son generalmente conocidas en la técnica de los inmunoensayos.

Los métodos de la presente descripción son también útiles para la detección de ácidos nucleicos. En una realización un método hace uso de sondas de ácido nucleico marcado con enzimas. Métodos ilustrativos incluyen ensayos de hibridación en solución, detección de ADN en Southern blot, ARN en Northern blot, secuenciación del ADN, huella de ADN, hibridaciones de colonia y transferencia de placas, cuya ejecución es bien conocida por el experto en la técnica.

Kits

La presente descripción también contempla proporcionar kits para llevar a cabo ensayos según los métodos de la presente descripción.

En la presente memoria se describe un kit que contiene materiales de ensayo incluidos sbp marcado con quimioluminiscente, sbd marcado con activador, inhibidor selectivo de señal, y solución activadora. En algunas realizaciones, dichos materiales de ensayo se proporcionan en solución acuosa. En algunas realizaciones, uno o más de los materiales de ensayo se proporcionan en solución acuosa concentrada. Las soluciones acuosas concentradas de los materiales de ensayo se suministran a una mezcla de reacción en volúmenes que permiten alcanzar la concentración final deseada de cada material de ensayo. En algunas realizaciones, se proporciona solución acuosa adicional para la dilución de soluciones acuosas concentradas. En otras realizaciones, se proporcionan uno o más materiales de ensayo en forma liofilizada o sólida. En dichas realizaciones, se puede proporcionar solución acuosa adicional para convertir el material de ensayo liofilizado o sólido en solución acuosa o concentrado en solución acuosa.

En algunas realizaciones, se proporciona cada material de ensayo en un recipiente aparte. En otras realizaciones del kit, se proporcionan uno o más materiales en un recipiente común. En otras realizaciones del kit, se proporcionan uno o más materiales de ensayo en un recipiente conjunto dividido en pocillos, en donde cada pocillo contiene un material de ensayo.

Los kits pueden comprender, en combinación envasada, marcas quimioluminiscentes, ya sea como compuestos marcadores libres, compañeros de unión específica marcados con quimioluminiscente, o sustancias auxiliares marcadas con quimioluminiscente tales como proteínas de bloqueo, junto con solución activadora e instrucciones de uso. Los kits pueden contener opcionalmente también conjugados de activador, controles y calibradores del analito, diluyentes y tampones de reacción si el marcado quimioluminiscente lo va a llevar a cabo el usuario.

Sistemas

Los métodos de ensayo descritos en la presente descripción pueden ser automatizados para una rápida ejecución empleando un sistema. Un sistema para llevar a cabo ensayos de la presente descripción requiere las capacidades de manejo de fluidos para la preparación de alícuotas y para transferir la solución activadora a un reactor que contiene los otros reactivos y leer la señal quimioluminiscente resultante. En realizaciones de dicho sistema, se coloca un luminómetro en posición proximal al reactor en el momento y en el lugar de la inyección de solución activadora. Preferiblemente, el sistema de detección que incluye luminómetro y otro dispositivo de detección actúa conjuntamente con el sistema de manejo de fluidos que inyecta la solución activadora. De forma adicional, un sistema automatizado para llevar a cabo ensayos de la presente descripción tiene capacidades de manejo de fluidos para la preparación de alícuotas y para el suministro de los otros reactivos y de muestra a un reactor. En una realización, un sistema para llevar a cabo el método de ensayo de la presente invención incluye un sistema de manejo de fluidos para el suministro de muestra a la mezcla de reacción, un sistema de manejo de fluidos para suministrar un compañero de unión específica marcado con quimioluminiscente, un compañero de unión específica marcado con activador, inhibidor de señal selectivo a una mezcla de reacción, y un sistema de manejo de fluidos para el suministro de la solución activadora a la mezcla de reacción para liberar una señal quimioluminiscente; y un sistema de detección para detectar la señal quimioluminiscente, en donde el sistema de manejo de fluidos para el suministro de la solución activadora actúa conjuntamente con el sistema de detección para medir las liberaciones de señal quimioluminiscente en el momento de la inyección de fluido activador y después. Dichos sistemas de manejo de fluido pueden ser el mismo sistema o sistemas dependientes de la configuración del sistema.

Se modificó un instrumento DXI 800 modificado para llevar a cabo los métodos de ensayo de la presente descripción. En el manual del usuario del UniCel DXI, ©2007, Beckman Coulter, se describe de forma más detallada el instrumento DXI 800 sin modificaciones.

Para usar en la realización de los métodos descritos en la presente memoria, se modificó un instrumento de inmunoensayo DXI® 800 incorporando un luminómetro de conteo de fotones (el mismo modelo que el usado en el instrumento DXI 800 comercial) situado para la detección cerca de la posición del reactor (a aproximadamente 19 mm) durante la inyección de solución activadora y justo después.

El sistema de suministro de sustrato incluido en el inmunoensayo mediante el DXI® 800 se utilizó para suministrar solución activadora. Por comodidad de uso, se retiraron algunos componentes adicionales del equipo de inmunoensayo DXI® 800 no necesarios para ensayos según los métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo, imanes y el sistema de aspiración utilizados para la separación y el lavado necesario para el inmunoensayo convencional, pero no utilizados en los métodos de la presente invención. El instrumento de inmunoensayos DXI® 800 modificado se utilizó por comodidad de uso en el manejo del reactor automatizado, pipeteado de reactivos, detección, y control de la temperatura a 37 °C. Igualmente, se pueden utilizar otros instrumentos comerciales para llevar a cabo los métodos de ensayo descritos en la presente memoria, siempre y cuando el equipo sea capaz de inyectar o pueda modificarse para inyectar solución activadora a un reactor y comenzar la detección de señal quimioluminiscente de forma simultánea o prácticamente simultánea. La detección de señal quimioluminiscente puede ser de muy corta duración, de varios milisegundos, por ejemplo, un ciclo de un tubo fotomultiplicador (PMT) o se puede extender durante varios segundos. Toda la señal recogida, o parte de ella, se puede utilizar para el análisis posterior de los datos.

La detección de señal quimioluminiscente puede ser de muy corta duración, de varios milisegundos, por ejemplo, un ciclo de un tubo fotomultiplicador (PMT) o se puede extender durante varios segundos. Toda la señal recogida, o parte de ella, se puede utilizar para el análisis posterior de los datos. Por ejemplo, en un procedimiento típico descrito más adelante en la presente memoria, se suma la intensidad lumínica durante 0,25 s, centrada sobre el haz de luz; en otros procedimientos, la intensidad lumínica se suma durante 5 s siendo los primeros 0,5 s un retardo previo a la inyección.

Ejemplos

Glosario:

AHTL: N-acetil homocisteína lactona

AK: acridán

CKMB: isoenzima creatinquinasa

DMF: dimetil formamida

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

HRP: peroxidasa del rábano picante

MS-PEG: polímero de polietilenglicol lineal aminorreactivo con grupos metilo terminales

Na2EDTA: sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético.

NHS: N-hidroxisuccinimida

PEG: polietilenglicol; de forma específica oligómeros o polímeros con un peso molecular < 20.000 g/mol.

PEO: óxido de polietileno; de forma específica polímeros con peso molecular > 20.000 g/mol.

PMP: 1-fenil-3-metil-5-pirazolona

PSA: antígeno prostático específico

Sulfo-SMCC: Sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato

TBS: Solución salina tamponada con Tris

Tnl: Troponina I; cTnl es Troponina I cardíaca.

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol, también conocido como tris-(hidroximetil)aminometano

5 Tween®-20: monolaurato de polioxietileno(20) sodio; comercializado por Sigma-Aldrich, St. Louis (MO).

Materiales:

10 Muestras de concentración conocida: Se prepararon de forma típica muestras de concentración conocida para usar en los ensayos y métodos de ensayo descritos a continuación añadiendo proteína purificada del analito designado a suero humano exento de ese analito. Por ejemplo, se prepararon muestras de PSA de proteínas de PSA conocidas introduciendo PSA derivado de fluido seminal humano en suero de mujer exento de PSA para lograr la concentración de PSA indicada en las tablas presentadas en los ejemplos siguientes. Las muestras, si se almacenaban antes del uso, se almacenaron a 4 °C o se congelaron y se descongelaron antes del uso. Las

15 muestras de concentración conocidas se prepararon generalmente del modo habitual para sets de calibración útiles para la generación de una curva estándar para usar en combinación con los métodos de ensayo para determinar la concentración del analito en muestras de concentración de analito desconocida.

20 Solución activadora que incluye potenciador: Una solución activadora acuosa utilizada en muchos de los ejemplos siguientes se denomina Solución Activadora A. La Solución Activadora A contiene ácido p-hidroxicinámico 8 mM, Na2EDTA 1 mM, peróxido de urea 105 mM, y Tween®-20 al 0,2 % en una solución tamponadora acuosa de Tris 25 mM a pH 8,0 con etanol de aproximadamente el 3 %. Todos los componentes son comercializados por diversos proveedores, tales como Sigma, St. Louis, MO.

25 Tampón II: (solución salina tamponada con TRIS, tensioactivo, azida de sodio <0,1 %, y ProClin ® 300 al 0,1 % (Rohm and Haas) comercializado por Beckman Coulter, Inc., Brea CA.).

Instrumentos:

30 Instrumento de inmunoensayo Dxl® 800 modificado (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA): Se utilizó un instrumento DXI® 800 modificado para llevar a cabo los métodos de ensayo descritos más adelante en la presente memoria en diversos ejemplos. Para usar en la realización de los métodos descritos en la presente memoria, se modificó un instrumento DXI® 800 incorporando un luminómetro de conteo de fotones (mismo modelo que el utilizado en el instrumento DXI® 800 comercial) situado para la detección cerca de la posición del reactor (aproximadamente a 19 mm) durante la inyección de la solución activadora y justo después. El sistema de suministro de sustrato incluido en el inmunoensayo mediante el DXI® 800 se utilizó para suministrar solución activadora. Por comodidad de uso, se retiraron algunos componentes adicionales del equipo de inmunoensayo DXI® 800 no necesarios para ensayos según los métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo, imanes y el sistema de aspiración utilizados para la separación y el lavado necesario para el inmunoensayo convencional, pero no utilizados en los métodos de la presente invención. El instrumento de inmunoensayos DXI® 800 modificado se utilizó por comodidad de uso en el manejo del reactor automatizado, pipeteado de reactivos, detección, y control de la temperatura a 37 °C. Igualmente, se pueden utilizar otros instrumentos comerciales para llevar a cabo los métodos de ensayo descritos en la presente memoria, siempre y cuando el equipo sea capaz de inyectar o pueda modificarse para inyectar solución activadora a un reactor y comenzar la detección de señal quimioluminiscente de forma simultánea o prácticamente simultánea. Más adelante en la presente memoria se indican otros instrumentos ilustrativos.

45

La detección de señal quimioluminiscente puede ser de muy corta duración, de varios milisegundos, por ejemplo, un ciclo de un tubo fotomultiplicador (PMT) o se puede extender durante varios segundos. Toda la señal recogida, o parte de ella, se puede utilizar para el análisis posterior de los datos.

50 Luminómetro de placas Luminoskan Ascent®, (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA). No modificado. Métodos realizados a temperatura ambiente.

Luminómetro de microplacas SpectraMax® L, (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) sin modificar. Métodos realizados a temperatura ambiente utilizando modo cinético de lectura rápida.

55

Ejemplo 1. Estudio de la eficacia de compuestos como SSIA

A. Estudio de SSIA mediante inmunoensayo de PSA homogéneo

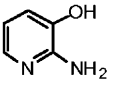
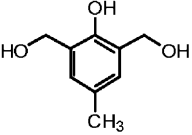
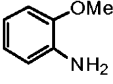
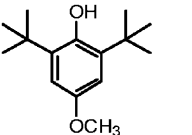
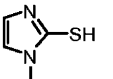
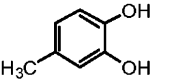
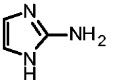
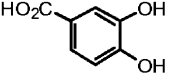
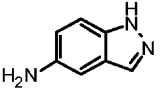
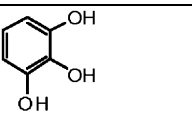
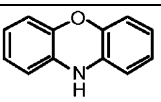
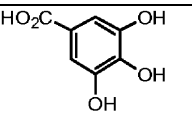
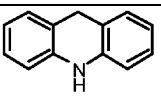
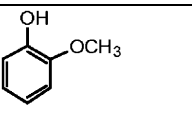
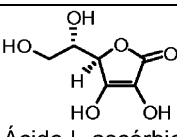
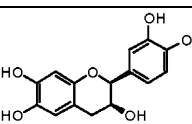
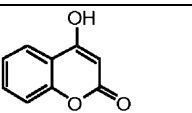
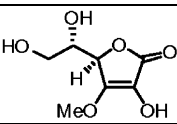
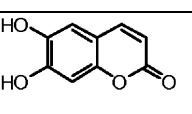
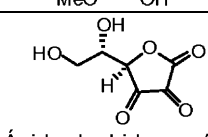
60 Este ejemplo presenta un método utilizado para evaluar la funcionalidad de compuestos candidatos a SSIA en ensayos de la presente descripción. La evaluación se llevó a cabo en un inmunoensayo de análisis de modelo de la proteína PSA. Se realizaron pruebas utilizando un formato de placas de microtitulación de 96 pocillos. Se pipetearon a cada pocillo una solución que contenía 30 µl de anti-PSA-AK1 de ratón (66 ng), 30 µl de anti-PSA-HRP de ratón conjugado (7,8 ng), 36 µl de suero humano femenino, y 24 µl de calibrador de PSA. La placa se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Se añadió a cada pocillo una alícuota de 5 µl (diversas concentraciones). La quimioluminiscencia se disparó mediante la adición de 100 µl de una solución de una solución activadora cuya composición se indica más adelante en la presente memoria. El

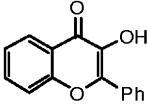
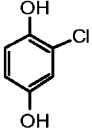
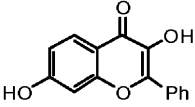
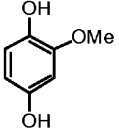
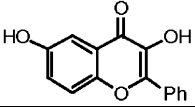
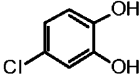
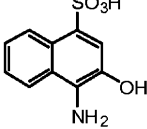
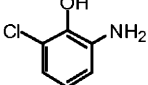
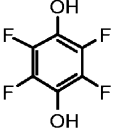
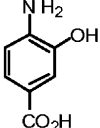
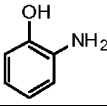
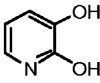
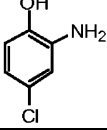
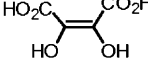
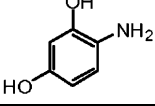
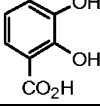
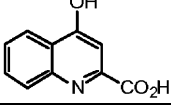
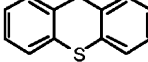
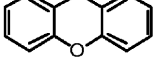
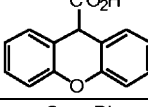
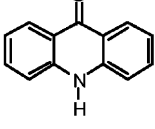
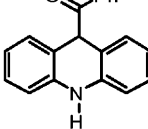
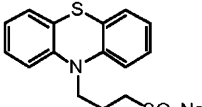
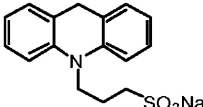
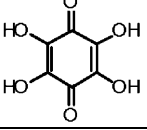
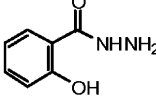
65

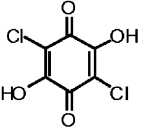
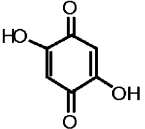
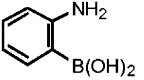
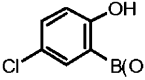
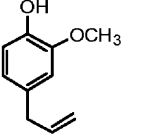
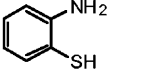
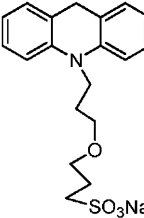
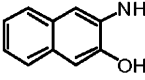
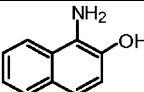
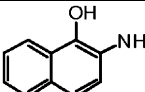
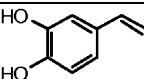
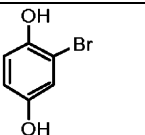
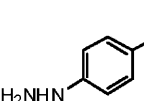
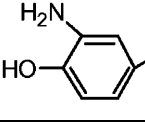
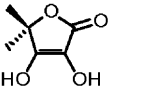
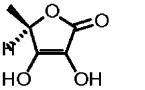
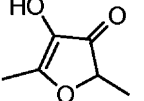
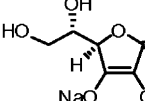
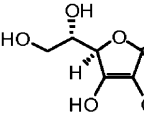
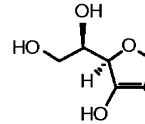
destello de quimioluminiscencia se integró durante 5 segundos después de la adición de la solución activadora utilizando un luminómetro de placas Luminoskan Asent®, (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA).

Se sometió a prueba cada compuesto candidato para al menos dos niveles de PSA: cero y 129 ng PSA/ml (calibrador S5) y/o 2 ng PSA/ml (calibrador S2). Para una mayor brevedad, solo se presentan los resultados de una concentración representativa de cada compuesto candidato. Los compuestos se consideran eficaces en términos de eficacia de ensayo si se mejora la relación S5/S0 con respecto a un control. Es deseable que el factor de mejora sea al menos 2 ($S5/S0 \geq$ aproximadamente 20-30) y, más deseable, que el factor de mejora sea al menos 5 ($S5/S0 \geq$ aproximadamente 50), aún más deseable que $S5/S0$ sea ≥ 100 en la presente prueba de evaluación. En esta prueba de evaluación se encontraron muchos compuestos que presentaban eficacia como SSIA, otros que eran ineficaces o tenían un efecto limitado.

Tabla 9: Compuesto experimental, concentración final y S5/S0

Compuesto de ensayo	Conc.	S5/S0	Compuesto de ensayo	Conc.	S5/S0
Control (Suero)		5-10		0,122 mM	32
	0,122 mM	23		0,122 mM	7
	0,122 mM	19		36,7 mM	102
	0,122 mM	142		24,4 mM	14
	0,122 mM	178		12,2 mM	10
	0,122 mM	69		0,122 mM	605
	0,122 mM	135		0,122 mM	120
	0,122 mM	13		0,122 mM	423
	0,122 mM	323	sal de ascorbato de sodio (anión ascorbato)	0,122 mM	495
	0,122 mM	17		122 uM	16
	0,122 mM	105		0,122 mM	26
			Ácido deshidroascórbico		

	0,122 mM	13		0,111 mM	229
	0,122 mM	14		0,111 mM	161
	0,122 mM	9		0,244 mM	409
	0,122 mM	65		0,244 mM	300
	0,014 mM	50		0,122 mM	153
	0,122 mM	649		0,122 mM	41
	0,244 mM	205		0,122 mM	30
	0,030 mM	161		0,122 mM	22
	0,122 mM	6		0,122 mM	9
	0,122 mM	4		0,122 mM	7
	0,122 mM	14		0,122 mM	9
	0,244 mM	50		0,244 mM	15
	0,061 mM	51		0,061 mM	23

	0,031 mM	7		0,244 mM	14
	0,122 mM	108		0,244 mM	22
	0,244 mM	30		0,122 mM	234
Glutathión	122 uM	77	DTT	72 uM	20
L-Cisteína	122 uM	22	NH ₂ NH ₂	244 uM	15
NaN ₃	34 uM	19	Na ₂ SO ₃	15 uM	59
TMB	61 uM	20	Etilenglicol	122 uM	14
	0,244 mM	6		0,244 mM	67
	0,122 mM	63		0,244 mM	109
	0,122 mM	116		0,122 mM	570
	1,22 mM	138		0,244 mM	448
	0,122 mM	467		0,122 mM	423
	1,25 mM	237		122 μM	9,2
	122 μM	10,3		122 μM	10,3
			Ácido D-isoascórbico		

B. Sistema modelo para la selección del inhibidor selectivo de señal (SSIA) eficaz

Se desarrolló un sistema modelo y se empleó para evaluar y seleccionar compuestos con características de funcionamiento como agente inhibidor de señal selectivo en ensayos de la presente descripción. El sistema modelo utiliza una micropartícula conjugada con BSA (albumina de suero bovino) marcada con una marca quimioluminiscente de estreptavidina y acridán keteneditioacetal (AK1) como el sbp marcado con quimioluminiscente, y HRP biotinilada como par de unión específica marcado con activador. En el sistema modelo, se añaden cantidades diversas de Btn-HRP al par de unión específica marcado con quimioluminiscente en cantidades de 0, 1, 10, 100 y 250 ng/ml. Se añade HRP sin marcado adicional para obtener una HRP total de una concentración de 500 ng/ml en cada mezcla de reacción. Se proporcionó HRP sin marcar en combinación con el sbp

marcado con activador a las micropartículas de sbp marcado con quimioluminiscente para reproducir la muestra. También se añadió un compuesto para evaluarlo como SSIA. Esta mezcla de reacción del sistema modelo es entonces activada mediante adición de una solución activadora conforme a los ensayos de la presente descripción.

5 C. Preparación de materiales para sistema modelo:

Para preparar el sbp marcado con quimioluminiscente sobre micropartículas, se biotiniló albumina de suero bovino (BSA) con exceso 4 veces molar de biotin-LC-sulfoNHS (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, EE. UU.). Se retiraron reactivos no unidos por desalación o diálisis. A continuación, se hizo reaccionar la biotina-BSA con un exceso 5 veces molar de un éster de NHS de acridán ketenedioacetal AK1 en fosfato sódico 20 mM de pH 7,2 : DMSO 75:25, volumen/volumen) seguido de desalación en el mismo tampón. La BSA con marcado dual (biotina y AK1) se acopló a continuación con micropartículas de M280 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.) activadas con tosilo en un tampón de borato 0,1 M de pH 9,5 a una concentración de aproximadamente 20 µg de BSA marcada por mg de micropartículas durante 16-24 h a 40 °C. Después del acoplamiento se depuraron las micropartículas durante 1 h a 40 °C con TRIS base 0,2 M, SDS 2 %, pH ~ 11. El proceso de depuración se repitió una vez más. A continuación, se suspendieron las micropartículas en un tampón salino (BSA/TBS) tamponado con BSA/TRIS al 0,1 % y se añadió estreptavidina (SA) a una concentración de aproximadamente 15 µg de SA por mg de micropartículas. La estreptavidina se mezcló con las micropartículas durante 45-50 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las micropartículas tres veces y se suspendieron en la misma mezcla BSA/TBS. La carga de dichas micropartículas es de 5 µg de proteína biotinilada por mg de micropartículas.

Se biotinizó HRP, (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE. UU.) con exceso 4 veces molar de biotin-LC-sulfoNHS (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, EE. UU.). De forma alternativa, se puede utilizar exceso 25 veces molar de biotina-PEO4- NHS. Se retiraron reactivos no unidos por desalación o diálisis.

25 Cada compuesto de SSIA para evaluar se disolvió en Tampón II: a una concentración de al menos 10 veces la concentración de intensidad de trabajo.

D. Procedimiento de evaluación utilizando sistema modelo

30 Se mezclaron 25 µl de partículas de BSA M280 con una concentración de 1 mg/ml con marcado dual (biotina y AK1) con 45 µl de SSIA de concentración de trabajo en Tampón II. El volumen de evaluación se aumentó a 85 µl añadiendo 15 µl de Tampón II. Se añadieron 15 µl de muestra que contenía Btn-HRP:HRP en diferentes relaciones (La cantidad de HRP biotinizada varió de 0, 1, 10, 100 y 250 ng/ml). La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a 37 °C, añadiéndose a continuación 100 µl de solución activadora y se registró la intensidad lumínica. El volumen total de
35 mezcla de reacción, incluida la solución activadora, fue de 200 µl con una concentración final de 100 µM de SSIA

Tabla 10

	Compuesto sometido a evaluación de eficacia como SSIA			
	Tampón II Control	2-aminofenol	Ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico	hidrocloruro de 4-aminoresorcinol
BTN-HRP0	15.901	65	972	675
BTN-HRP1	46.464	356	2.808	1.163
BTN-HRP10	2.035.193	8.632	441.455	74.764
BTN-HRP100	5.755.341	2.092.703	5.906.521	330.056
BTN-HRP250	6.255.297	4.008.689	6.403.425	259.541
S/S0	1,0	1,0	1,0	1,0
S1/S0	2,9	5,5	2,9	1,7
S2/S0	128,0	132,8	454,2	110,8
S3/S0	361,9	32195,4	6076,7	489,0
S4/S0	393,4	61672,1	6587,9	384,5
	Control tampón II	4-clorocatecol	2-cloro-1,4-dihidroxibenceno	Ácido ascórbico
BTN-HRP0	16.161	93	3.571	97
BTN-HRP1	43.300	205	4.007	757
BTN-HRP10	1.769.373	1.373	188.920	16.641
BTN-HRP100	6.027.591	456.707	610.053	3.692.291
BTN-HRP250	6.162.340	1.260.937	875.831	6.036.145
S/S0	1,0	1,0	1,0	1,0

ES 2 622 977 T3

S1/S0	2,7	2,2	1,1	7,8
S2/S0	109,5	14,8	52,9	171,6
S3/S0	373,0	4910,8	170,8	38064,9
S4/S0	381,3	13558,5	245,3	62228,3

Tabla 11

	Tampón II Control	Trolox®	Ácido ascórbico	6-palmitato del ácido ascórbico	5,6-iso-propileno ácido ascórbico	(+/-)-alfa-Tocoferol	(+)-gamma-Tocoferol	Ácido úrico
BTN-HRP0	23.603	173	151	81	264	2.772	6.051	5.532
BTN-HRP1	45.016	1.460	995	327	961	6.468	10.924	9.760
BTN-HRP10	2.149.712	37.291	32.568	40.863	29.645	1.253.187	1.686.079	1.025.209
BTN-HRP100	8.926.151	7.251.008	4.553.473	8.187.204	4.917.499	8.560.469	8.698.069	8.712.328
BTN-HRP250	9.660.668	10.794.247	8.915.869	10.182.411	8.784.595	9.628.184	10.282.504	10.708.733
S/S0	1	1	1	1	1	1	1	1
S1/S0	1,9	8,4	6,6	4	3,6	2,3	1,8	1,8
S2/S0	91,1	215,1	216,2	502,4	112,3	452,1	278,7	185,3
S3/S0	378,2	41832,7	30222,2	100662,3	18626,9	3088,2	1437,5	1574,9
S4/S0	409,3	62274,5	59176,1	125193,6	33275	3473,4	1699,4	1935,8
	Tampón II Control	Ácido ferúlico	Ácido siringico	G.W.7.35				
BTN-HRP0	27.659	5.252	14.485	67.556				
BTN-HRP1	56.887	12.079	23.707	92.403				
BTN-HRP10	1.929.315	715.313	939.372	1.600.767				
BTN-HRP100	8.598.556	8.785.865	7.927.096	7.938.477				
BTN-HRP250	9.255.947	10.244.269	9.530.979	9.509.801				
S/S0	1	1	1	1				
S1/S0	2,1	2,3	1,6	1,4				
S2/S0	69,8	136,2	64,8	23,7				
S3/S0	310,9	1672,9	547,2	117,5				
S4/S0	334,6	1950,5	658	140,8				

Tabla 12

	Control	Glutación	Cisteína	Ácido lipoico
BTN-HRP0	30.493	26.977	35.695	35.016
BTN-HRP1	80.841	55.719	58.203	71.751
BTN-HRP10	2.489.892	2.480.764	2.483.411	2.450.949
BTN-HRP100	8.931.915	8.733.068	9.147.371	8.647.037
BTN-HRP250	9.246.768	9.965.235	10.190.505	8.847.921
S/S0	1	1	1	1
S1/S0	2,7	2,1	1,6	2
S2/S0	81,7	92	69,6	70,0
S3/S0	292,9	323,7	256,3	246,9
S4/S0	303,2	369,4	285,5	252,7

	Control	Resveratrol	Melatonina	N-Ac-Cisteína	TEMPOL	Hidrazida nicotínica
BTN-HRPO	30.108	64.051	54.528	43.647	22.621	42.260
BTN-HRP1	52.680	81.452	70.741	47.636	33.873	58.356
BTN-HRP10	2.307.964	1.073.968	2.381.361	1.757.607	1.963.369	2.106.471
BTN-HRP100	8.866.105	5.944.792	9.471.431	8.685.795	9.220.799	8.205.320
BTN-HRP250	9.055.791	6.559.359	10.370.061	10.219.869	10.578.104	7.923.092

S/S0	1	1	1	1	1	1
S1/S0	1,7	1,3	1,3	1,1	1,5	1,4
S2/S0	76,7	16,8	43,7	40,3	86,8	49,8
S3/S0	294,5	92,8	173,7	199	407,6	194,2
S4/S0	300,8	102,4	190,2	234,2	467,6	187,5
	Control	Toco-PEG	Acrilamida/bis- acrilamida 19:1	Acrilamida/bis- acrilamida 37,5:1	Ácido nicotínico	
BTN-HRP0	30.608	33.836	28.760	36.028	34.369	
BTN-HRP1	144.936	44.180	50.829	56.267	53.765	
BTN-HRP10	2.255.845	1.970.753	2.286.095	2.187.617	2.228.317	
BTN-HRP100	8.581.227	8.352.891	8.216.691	8.094.544	8.772.523	
BTN-HRP250	9.183.040	9.383.395	8.629.933	8.463.999	9.224.439	
S/S0	1	1	1	1	1	
S1/S0	1,5	1,3	1,8	1,6	1,6	
S2/S0	73,7	58,2	79,5	60,7	64,8	
S3/S0	280,4	246,9	285,7	224,7	255,2	
S4/S0	300	277,3	300,1	234,9	268,4	

Compuestos que demuestran utilidad como SSIA para usar en ensayos de la presente descripción incluyen: Ácido ascórbico, derivados de 6-palmitato y 5,6-isopropilideno del Ácido ascórbico, 2-aminofenol, ácido 4-Amino-3-hidroxi-benzoico, 4-clorocatecol y TROLOX, un derivado de Tocoferol, con reducciones en la señal de fondo indicadas por comparación de los valores S0 con el control, y mejoras en la relación señal/ruido evidenciadas por valores S1/S0 crecientes.

Compuestos que han mostrado insuficiente eficacia como SSIA en el sistema modelo son: glutatión, cisteína, N-acetilcisteína, ácido lipoico (un disulfuro), tocoferol pegilado, melatonina (un derivado de la triptamina), TEMPOL (un nitróxido estable), hidrazida nicotínica, ácido nicotínico, Resveratrol y dos soluciones de acrilamida/bis-acrilamida. Un segundo grupo de compuestos, incluidos el alfa-Tocoferol y el gamma-Tocoferol, el ácido úrico y el ácido ferúlico muestran una reducción en la señal S0 en el intervalo de 75-88 %, pero no muestran aumento de S/S0 hasta el tercer nivel de cal. a 10 ng/ml de Btn-HRP.

Las pruebas de evaluación se llevaron a cabo utilizando un sistema de inmunoensayo Dxl® modificado (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, EE. UU.) como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

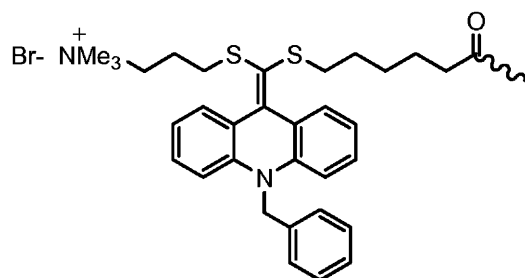
Ejemplo 2:

El siguiente ejemplo demostró inmunoensayo de un analito en ausencia de fase sólida, tanto en presencia como en ausencia de SSIA. El ensayo incluía dos anticuerpos con marcado directo, cada uno de los cuales tiene afinidad de unión específica con el analito, en este Ejemplo, antígeno prostático específico (PSA). Un anticuerpo, designado "Ab1" por comodidad de uso, se une covalentemente a una o más moléculas, de forma típica dos moléculas, de AK11. Un segundo anticuerpo, designado "Ab2", se une covalentemente a HRP. La preparación de los materiales, la eficacia del ensayo y los resultados fueron como se describe más adelante en la presente memoria.

A. Preparación de conjugado Ab1~AK

En el siguiente ejemplo, un éster de NHS de un compuesto quimioluminiscente de acridán ketenoditioacetal, denominado en la presente memoria AK1 (mostrado anteriormente en la presente memoria) se une covalentemente a un anticuerpo de antígeno prostático específico (PSA). El siguiente método se puede también emplear para preparar anticuerpos marcados con quimioluminiscente de otros antígenos u otros compuestos quimioluminiscentes de acridán ketenoditioacetal.

Se preparó AK1, un compuesto quimioluminiscente de acridán ketenoditioacetal aminorreactivo en DMSO 10 mM. A 3 mg (6,6 mg/m.) de un anticuerpo de PSA monoclonal en PBS, se añadió un exceso 10 veces molar, a pH 7,4, y se incubó en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. El producto se purificó sobre una columna de desalación PD-10, equilibrada en PBS, a pH 7,4. El producto contenía anti-PSA monoclonal unido covalentemente a AK11 (producto de reacción de AK1), mostrado a continuación con unión al anticuerpo indicada por una línea ondulada, a través de grupos amino disponibles del anticuerpo. Las mediciones de absorbancia a 280 y 384 nm se utilizaron para determinar la concentración de IgG y la relación AK11/IgG (3 AK11:1 IgG).



AK11

B. Preparación de conjugado Ab-2~HRP

- 5 En el siguiente procedimiento sintético representativo, la enzima peroxidasa del rábano picante (HRP) se une covalentemente a un anticuerpo contra el antígeno prostático específico (PSA). Siguiendo el método descrito en la presente memoria, se pueden preparar anticuerpos marcados con enzima adicionales.

C. Activación de HRP

- 10 Se disolvieron 10 mg de HRP (Roche, 10-814-393-001) en 2,0 ml de 1xPBS (NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, y un pH de 7,4). Se añadió un exceso 30 veces molar de sulfo-SMCC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) en DMSO (25 ug/ul) a la solución de HRP y se incubó en la oscuridad durante 1 hora. La HRP activada con maleimida se purificó sobre una columna de desalación PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) en PBS, pH 7,4. La concentración de HRP se determinó espectrofotométricamente, utilizando un
- 15 coeficiente de extinción de 2,275 ml/mg-cm a 403 nm.

D. Activación de anticuerpo monoclonal anti-PSA (Ab2)

- 20 Se añadió un exceso 50 veces molar de 2-iminotiolano (Thermo Fisher Scientific, Piscataway, NJ, EE. UU.) a anticuerpo contra PSA monoclonal en PBS, pH 7,4 y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora en la oscuridad. El anticuerpo contra PSA monoclonal, designado Ab2, difiere del Ab1 del Ejemplo 2 en el sitio de unión a PSA. El anticuerpo tiolado se purificó sobre una columna de desalación PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) en PBS, pH 7,4. La concentración del anticuerpo se determinó
- 25 espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción de 1,4 ml/mg-cm a 280 nm.

E. Preparación de conjugado Ab2-HRP

- 30 Se añadió un exceso de 5 veces de HRP activada a la solución de Ab2 activado para crear una mezcla de reacción conjugada. La mezcla de reacción conjugada se incubó sobre un rotador a temperatura ambiente durante 2 horas en la oscuridad. Los grupos tiol y maleimida que no habían reaccionado se bloquearon mediante adiciones secuenciales de una cantidad en exceso de L-cisteína y yodoacetamida (15 minutos cada etapa) para conjugar la mezcla de reacción. En la primera etapa, se añadió un exceso (0,025X volumen de reacción) de L-cisteína-HCl 50 mg/ml (disuelta en PBS, pH 7,4) y se incubó 15 minutos. En la segunda etapa, se añadió un exceso (0,04X volumen de reacción) de
- 35 yodoacetamida 50 mg/ml (disuelta en PBS, pH 7,4) a la mezcla de reacción junto con Borato 50 mM, pH 8,5 (0,08X volumen de reacción) y se incubó durante otros 15 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. El conjugado se purificó sobre una columna Superdex 200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU., núm. de parte 17-5175-01) equilibrada en PBS, pH 7,4. Se agruparon las fracciones que contenían el conjugado y se determinó espectrofotométricamente la relación HRP/IgG, como se describe en A y B. La relación HRP/IgG calculada fue de 1,4.

Ensayo de PSA con SBP con marcado directo con SSIA.

- 40 Se suministró el conjugado Ab1-AK11 en PBS, pH 7,4 a 10 µg/ml. Se suministró el conjugado Ab2-HRP en PBS, pH 7,4 a 0,25 µg/ml. En un primer reactor se añaden 25 µl de conjugado Ab1-AK11, de ácido ascórbico 600 µM
- 45 en agua desionizada, y 25 µl de conjugado Ab2-HRP a 25 µl de muestra y se incubó durante 15 minutos. A modo de comparación sin SSIA, en un segundo reactor se añadieron 25 µl de conjugado Ab1-AK11, 25 µl de agua, 25 µl de conjugado Ab2-HRP a 25 µl de muestra y se incubó durante 15 minutos.

- 50 Después de la incubación, la reacción quimioluminiscente se inicia en cada reactor mediante la inyección de 100 µl de solución activadora A. De forma simultánea a la inyección de la solución activadora en el reactor, se detectó la señal quimioluminiscente utilizando un luminómetro que incorporaba un tubo fotomultiplicador de conteo de fotones (PMT). Se continuó recogiendo señal durante 3,85 segundos y los datos de señal quimioluminiscente se almacenaron en un ordenador.

- 55 Se analizó cada muestra por triplicado según el método de ensayo anterior. Los datos de RLU recogidos para cada muestra sometida a ensayo durante el intervalo de tiempo de 495 milisegundos comenzando

125 milisegundos después del inicio de la introducción de la solución activadora al reactor se sumaron para cada ejecución individual, se promediaron utilizando los triplicados para cada muestra y se presentan en la Tabla 13. Se calculó una relación señal/ruido (S/S0) para cada valor de concentración. Los datos de la Tabla 13 se pueden utilizar para generar una curva de calibración para el análisis de muestras de concentración desconocida en PSA.

Tabla 13.

PSA, ng/ml	Sin SSIA		Con SSIA	
	RLU	S/S0	RLU	S/S0
0,0	14388	1,0	180	1,0
0,4	9583	0,7	324	1,8
1,4	12980	0,9	755	4,2
7,0	13253	0,9	3032	16,8
51,0	28872	2,0	16373	91,0
101,6	36737	2,6	23119	128,4

El siguiente ejemplo demostró inmunoensayo según la presente descripción de un analito utilizando anticuerpos con marcado directo en ausencia de fase sólida, tanto en presencia como en ausencia de SSIA. A partir de los resultados mostrados en la Tabla 13, el ensayo de anticuerpos con marcado directo sin SSIA no proporciona respuesta a la dosis (de analito) a lo largo de todo el intervalo de concentraciones de PSA utilizadas en el ensayo, con. En cambio, el inmunoensayo con marcado directo que incorpora SSIA según la presente descripción es funcional, proporcionando respuesta a la dosis desde cero (control) y a lo largo de los 5 valores del calibrador de PSA. Por consiguiente, el inmunoensayo con marcado directo que incorpora SSIA se podría utilizar con éxito para determinar concentraciones de analito desconocidas en otras muestras. También, la adición de un SSIA mejora la relación señal/ruido (S/S0) en el intervalo de calibración (PSA, ng/ml de 0 a 101,6).

Ejemplo 3: Ensayo de conjugados AB1-AK1, AB2-HRP para PSA

Se llevaron a cabo ensayos dirigidos a PSA, utilizando sbp marcado con quimioluminiscente con marcado directo y sbp marcado con activador en solución como se describe a continuación. Este experimento exploró de forma adicional el resultado del empleo de reactivos conjugados con diferentes grados de purificación.

Se hicieron reaccionar anti-PSA de ratón (MxPSA) (111 µl, 9 mg/ml) y éster de AK1 NHS (106 µl, 1 mg/ml de solución madre de DMF) en tampón borato 0,1 M, pH 8,25 (784 µl). La mezcla se mezcló a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se retiraron 100 µl de mezcla de reacción y se añadieron y mezclaron durante 30 minutos 2,6 µl de una solución de lisina (2 mg/ml). Esta mezcla de reacción se diluyó en tampón PBS para usar en el ensayo del “conjugado no purificado”. Se purificó un conjugado preparado del mismo modo con una columna de desalación, como es conocida en la técnica, para usar en el ensayo del “conjugado purificado”.

Se pipetearon 30 µl de una solución de conjugado de MxPSA-AK1 (67 ng), 24 µl de calibrador (0-129 ng/ml PSA), 30 µl de conjugado de MxPSA-HRP (7,8 ng), y 36 µl de suero a tres pocillos de una placa de microtitulación blanca. La placa se incubó durante 10 minutos a 37 °C. Se añadieron 5 µl de una solución de ácido ascórbico (5,5 mM). La placa se colocó en un luminómetro de placa de inyección. Mediante el luminómetro se añadieron 100 µl de solución activadora A y se leyó la señal quimioluminiscente durante 5 segundos a partir de la adición de la solución activadora.

En la siguiente tabla se proporcionan la intensidad de la señal quimioluminiscente (unidades luminiscentes relativas, RLU) para las reacciones de conjugados MxPSA-AK1 “sin purificar” y “purificados” en función de la concentración de PSA en la mezcla de reacción.

Tabla 14

[PSA] (ng/ml)	Intensidad (RLU)	
	purificado	no purificado
0	1,6	1,7
0,5	4,1	4
2	10,2	9,6
10,8	35,5	43,5
77,2	328	319
129	485	555

Los datos proporcionados en la Tabla 14, cuando se transformaron en una representación log-log, mostraron que la intensidad logarítmica de señal quimioluminiscente frente a la concentración logarítmica de PSA era constante y

aproximadamente lineal en el intervalo de [PSA] de 0,5 ng/ml a 129 ng/ml, independientemente del nivel de purificación del reactivo conjugado MxPSA- AK1.

Ejemplo 4: Inmunoensayo competitivo

Se proporcionan inmunoensayos homogéneos de un analito que utiliza un anticuerpo de captura marcado con quimioluminiscente en combinación con analito marcado en una reacción de inmunoensayo competitiva. El analito ilustrativo AMP cíclico ("cAMP") se conjuga con HRP proporcionando un reactivo cAMP-HRP, que compite por el analito cAMP en el anticuerpo de captura ("Ab de captura") que se conjuga con AK5 para formar un complejo anticuerpo de captura- AK5. Por lo tanto, tras la formación del complejo anticuerpo de captura- AK5-cAMP-HRP y la adición de la solución activadora como se describe en la presente memoria, se puede observar quimioluminiscencia (es decir, "luz") en la medida en que se forma el complejo anticuerpo de captura- AK5-cAMP-HRP. El analito (cAMP) que no se conjuga con HRP compite por el complejo anticuerpo de captura- AK1 y, tras la adición de solución activadora, el complejo anticuerpo de captura- AK5-cAMP resultante no proporciona quimioluminiscencia (es decir, "no proporciona luz"). Por lo tanto, el analito cAMP compite por la captura del complejo anticuerpo de captura- AK5 y suprime por lo tanto la señal debido al complejo anticuerpo de captura-AK1- cAMP-HRP.

Se añadió 0,1 mg de anti cAMP de conejo (IMMUNOTECH, Marsella) (20,3 ul de solución madre 4,93 mg/ml) a 162 ul de tampón borato sódico 0,1 M, pH 8,25 en tubo de centrifuga de 1,7 ml. Se añadieron 17,6 ug de AK5 (17,6 ul de solución madre 1 mg/ml de DMF). Tras un mezclado en vórtex rápido el tubo se colocó en un agitador rotatorio durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió añadiendo 1,2 ul de L-lisina de solución madre 3 mg/ml. La mezcla de reacción se diluyó (1:1) en BSA 0,4 % y PBS y se almacenó a 4 C. Se preparó cAMP-HRP conforme a la bibliografía. Ver, por ejemplo, J Immunological Methods, 1992, 155 31-40. El cAMP se compró a Sigma, St. Louis, MO, EE. UU. Se preparó una solución madre 30 nM de cAMP en PBS y se diluyó adicionalmente en PBS para preparar calibradores de muestra para el ensayo. Ver Tabla 15.

El protocolo de ensayo competitivo fue el siguiente. Se añadieron anti cAMP de conejo monoclonal marcado con AK5 (0,275 ug/ml) (3 ul), cAMP marcado con HRP (0,09375 ug/ml) (3 ul) y calibradores de cAMP (4 ul) a una placa de bajo volumen 384 de poliestireno blanco. Las soluciones de conjugado tenían una concentración del 0,2 % en BSA. Tras incubar 30 minutos a temperatura ambiente, se añadió 1 ul de 2-aminofenol (0,6875 mM) seguido de una solución activadora (10 ul). La solución activadora contenía Tris 25 mM, pH 8, ácido p-hidroxicinámico 8 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,2 % y peróxido de urea 0,1 M. La intensidad lumínica se midió (con Spectromax) durante un segundo justo después de la inyección del disparador. Los reactivos no se expusieron a la luz durante la incubación y no se agitaron.

Como se muestra a continuación en la Tabla 15, los calibradores se utilizaron en el intervalo de 0,137 nM a 10.000 nM. Los datos se proporcionan en la Tabla 15, para los que el valor IC₅₀ calculado para el cAMP fue de 2,6 nM. Los datos demuestran que se puede lograr la completa supresión de la señal quimioluminiscente con niveles de analito cAMP superiores a 100 nM.

Tabla 15. Inmunoensayo de competición para cAMP

nM	Promedio	Supresión de señal
0	91646	0 %
0,137	89089	3 %
0,412	83377	9 %
1,23	66207	28 %
3,7	31156	66 %
11,1	4576	95 %
33,3	943	99 %
100	315	100 %
1000	173	100 %
10000	167	100 %

Ejemplo 5: Preparación de SBP marcado con quimioluminiscente incluida marca quimioluminiscente, bsa biotinilado, neutravidin y anticuerpo

Este ejemplo describe estructuras base o complejos "tetraméricos" formados por autoensamblaje mediante interacción no covalente de biotina y estreptavidina. El ejemplo también demuestra inmunoensayos para un analito utilizando la estructura base tetramérica.

A. Marcado de BSA con compuesto quimioluminiscente y biotina:

Se mezclaron albumina de suero bovino (BSA) con ulfo-NHS-LC-biotina (Thermo Scientific, Rockford IL) y éster de AK1-NHS (Lumigen, Southfield MI) en una relación molar de 7 moles de AK1 por mol de BSA; 3 moles de biotina por mol de BSA), y la mezcla se purificó sobre una columna de desalación PD-10 como se describe en el Ejemplo 17.

B. Preparación de conjugado Neutravidin-IgG

El anticuerpo monoclonal anti-PSA tiolado se preparó como se describe en el Ejemplo 2.

Se añadió un exceso 3 veces molar de maleimida-neutravidin activado (Thermo Scientific) a la solución de anti-PSA monoclonal tiolado (5 mg) y se incubó sobre un rotador a temperatura ambiente durante una hora en la oscuridad. Los grupos tiol y maleimida que no habían reaccionado se bloquearon mediante adiciones secuenciales de L-cisteína y yodoacetamida (15 minutos cada etapa) para conjugar la mezcla de reacción. El conjugado se purificó sobre una columna Superdex® 200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.), y se equilibró en PBS, pH 7,4, para retirar neutravidin sin reaccionar. Se agruparon las fracciones de HPLC que contenían el conjugado y se utilizaron en la preparación de los complejos de la estructura base tetramérica.

C. Preparación de complejos de estructura base que contienen IgG conjugada con neutravidin y BSA marcado

Se añadió un exceso 3 veces molar de BSA marcado, como se ha descrito anteriormente, a la IgG conjugada con neutravidin y se dejó que se formaran los complejos durante 30 minutos a temperatura ambiente. El producto final se purificó mediante HPCL como se ha descrito anteriormente, y los productos se almacenaron a 4 °C hasta volverlos a usar.

D. Inmunoensayo de PSA con estructura base tetramérica

El inmunoensayo para PSA se llevó a cabo sustancialmente como se describe en el Ejemplo 2. Resumiendo, se combinaron volúmenes iguales (de 25 µl en cada caso) de la estructura base tetramérica, conjugado de HRP, ácido ascórbico 600 µM y muestra de PSA en un reactor y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Después de la incubación, se inició una reacción quimioluminiscente mediante inyección de 100 µl de solución activadora A en el reactor. De forma simultánea a la inyección, se detectó la señal quimioluminiscente utilizando un luminómetro que incorporaba un tubo fotomultiplicador (PMT) en el transcurso de 275 milisegundos y los datos se almacenaron en un ordenador.

Se prepararon muestras de concentración conocida en PSA como se ha descrito anteriormente en la presente memoria para alcanzar las concentraciones de PSA indicadas en la Tabla 16. A continuación, se analizaron las muestras como se ha descrito anteriormente, y se utilizaron los datos para generar una curva de calibración para el análisis de muestras de concentración en PSA desconocida.

Tabla 16.

	Estructura base de anti-PSA-neutravidin-Biotina-BSA-AK1				
Concentraciones de inmunorreacción					
Estructura base (µg/ml IgG)	0,05	0,2	0,5	2	5
anti-PSA~HRP (µg/ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ácido ascórbico (µM)	600	600	600	600	600
[PSA] (ng/ml)	RLU (Promedio en el transcurso de 275 ms)				
0,0	40	55	72	81	139
0,4	93	180	357	616	777
1,4	281	747	1.456	2.245	2.469
7,0	3.085	8.983	14.819	16.717	13.931
51,0	43.316	153.325	302.112	467.243	279.741
101,6	59.096	210.419	445.267	933.172	792.293
	Relación señal/ruido				
0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,4	2,33	3,29	4,96	7,57	5,61
1,4	7,03	13,66	20,22	27,61	17,81
7,0	77,13	164,32	205,81	205,54	100,46
51,0	1082,90	2804,73	4196,00	5744,79	2017,37
101,6	1477,40	3849,12	6184,26	11473,43	5713,65

Ejemplo 6. Preparación de sustancia auxiliar marcada con quimioluminiscente, anticuerpo biotinilado y polímero de estreptavidina-igg autoensamblado

En este ejemplo se mezcló estreptavidina con marcado de AK1 con un anticuerpo biotinilado, formando de ese modo polímeros mediante autoensamblaje. Dichos polímeros de estreptavidina/biotina-IgG autoensamblados se pueden utilizar como estructuras base para inmunoensayo de un analito.

A. Preparación de estreptavidina marcada con AK1

Se disolvió AK1 (Lumigen, Southfield, MI, EE. UU.) en DMSO anhidro a una concentración de 30 mg/ml. Se añadieron seis (6) equivalentes molares a una solución de 10,1 mg/ml de estreptavidina (Streptavidin-plus®, Prozyme, San Leandro, CA, EE. UU.) a agua que contenía NaCl 50 mM. Se dejó que la reacción se desarrollase en la oscuridad durante 60 minutos y se purificó a continuación mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Sephadex® G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) equilibrada con PBS, pH 7,2. La relación molar AK11:proteína se determinó mediante espectroscopía de UV utilizando las siguientes ecuaciones:

$$[AK11] = A_{384}/11.380 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

$$[\text{estreptavidina}] = (A_{280} - (A_{384}/(A_{384}/A_{280} \text{ AK1}))) / 176.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

La segunda ecuación se utilizó para corregir la absorbancia de AK1 a 280 nm. Con estas condiciones, se alcanzó una relación molar de AK11:estreptavidina de 4,3 AK1 por estreptavidina con un rendimiento del 94 %.

Preparación de anticuerpo monoclonal anti-cTnI con marcado AK11

Se preparó anticuerpo con marcado de AK-1 como se describe en el Ejemplo 2, salvo por un exceso 15 veces molar de AK-1 a IgG para preparar la IgG con marcado directo.

B. Preparación de anticuerpos monoclonales anti-cTnI biotinilados

Se añadió un exceso 10 veces molar de NHS-LC-biotina (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.) a anticuerpo monoclonal anti-cTnI y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. El anticuerpo biotinilado se purificó mediante diálisis en PBS, pH 7,2. La relación molar biotina:anticuerpo, determinada utilizando el kit de cuantificación de biotina comercial de Thermo Scientific, fue de 4,9

C. Preparación de estructura base de polímero autoensamblado

Se preparó el polímero autoensamblado añadiendo 2 equivalentes molares de anticuerpo cTnI biotinilado a 1 equivalente molar de estreptavidina con marcado de AK11. La mezcla se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 90 minutos para permitir que se formaran los complejos. Se purificó la mezcla de reacción sobre una columna Superdex® 200 como se describe en el Ejemplo 3.

Se agruparon las fracciones de HPCL correspondientes al conjugado de alto peso molecular (800 kDa - >1,5 MDa) y se almacenaron a 4 grados C hasta su uso.

D. Inmunoensayo para cTnI

Se realizó el inmunoensayo para cTnI del modo siguiente. Se mezclaron 25 µl de la estructura base de polímero autoensamblado, o anticuerpo con marcado directo como control, conjugado de HRP, ácido ascórbico 600 µM y la mezcla se mezcló en un reactor, y se incubó durante 15 minutos. Después de la incubación, se inició la reacción de quimioluminiscencia mediante inyección de 100 µl de solución activadora A en el reactor. De forma simultánea a la inyección de la solución activadora al reactor, se detectó la señal quimioluminiscente utilizando un luminómetro que incorporaba un tubo fotomultiplicador (PMT) de conteo de fotones en el transcurso de 275 milisegundos y los datos se almacenan en un ordenador.

Se prepararon muestras de cTnI de concentración conocida añadiendo cantidades conocidas de cTnI nativa a suero humano normal para alcanzar las concentraciones de cTnI indicadas en la Tabla 17. Cada muestra se analizó por triplicado según el método anteriormente descrito en la presente memoria (y en el Ejemplo 4 para el inmunoensayo de PSA). Los datos de RLU recogidos para cada muestra sometida a ensayo en un intervalo de tiempo dado se sumaron para cada ejecución individual y se promediaron utilizando los triplicados correspondientes a cada muestra.

Se determinó una relación señal/ruido para las muestras a cada concentración conocida.

Tabla 17

[cTnl], ng/ml	IgG marcado con acridán (Control)	Estructura base de autoensamblaje de SA-IgG	
	RLU promedio		% Control
190	3.757.770	92.017.724	2449 %
41	1.326.964	20.703.152	1560 %
9,2	380.904	3.414.677	896 %
2,3	101.228	628.395	621 %
0,82	41.548	210.780	507 %
0,22	17.520	67.552	386 %
0,1	12.871	32.802	255 %
0	9.966	16.183	162 %
[cTnl], ng/ml	Relación señal/ruido		% Control
190	377,07	5685,99	1508 %
41	133,15	1279,30	961 %
9,2	38,22	211,00	552 %
2,3	10,16	38,83	382 %
0,82	4,17	13,02	312 %
0,22	1,76	4,17	237 %
0,1	1,29	2,03	157 %
0	1,00	1,00	100 %

5 Los datos de la Tabla 17 ilustraron una buena respuesta a la dosis para inmunoensayo de concentraciones de Tnl analito de 0 a 190 ng/ml para ambos formatos de ensayo. Los resultados del Ejemplo 6 mostraron también un aumento en intensidad de señal (mostrada por las RLU promedio) y mejora en la relación señal/ruido (S/S0) para el ensayo en el que se utilizan polímeros de estreptavidina/biotina-IgG (anticuerpo) en comparación con anticuerpo con marcado directo con acridán.

10 **Ejemplo 7: Preparación de SBP marcado con quimioluminiscente incluida marca quimioluminiscente, KLH, y anticuerpo acoplado a estreptavdina-biotina**

15 Este ejemplo demuestra el uso de hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH) en la preparación de una estructura base polimérica grande. Se conjuga KLJ activada con maleimida con anticuerpo y se marca con AK1 para formar la estructura base. Este ejemplo también demuestra el uso de dichas estructuras base en inmunoensayos de un analito.

A. Tiolación de anticuerpos monoclonales de la cTnl

20 Se tioló anti-cTnl monoclonal añadiendo N-acetil homocisteína lactona (AHTL) 50 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) al anticuerpo a pH 9,0, y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo tiolado se purificó utilizando una columna de desalación PD-10, como se describe en el ejemplo 2.

B. Preparación y marcado de estructura base de KLH

25 Se incubaron 3,4 mg de anti-cTnl tiolado a 10 mg de KLH activada con maleimida (núm. de producto 77605, ThermoScientific) y la solución resultante se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Para marcar el conjugado anticuerpo-KLH, se añadió 0,9 mg de éster de AK1-NHS, disuelto en 0,7 ml de DMSO, a la solución y se dejó reaccionar durante 15 minutos. A continuación, se purificó el conjugado mediante intercambio de tampón (fosfato 20 mM, EDTA 1 mM) utilizando un concentrador de centrifuga 30 kDa MWCO Ultracell (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.).

C. Inmunoensayo con estructura base de KLH de proteína grande

35 Se llevó a cabo un inmunoensayo para cTnl utilizando la estructura base de KLH de proteína grande como se describe en el Ejemplo 6. Se prepararon muestras de concentración en cTnl conocida como se describe en el Ejemplo 6. Resumiendo, se mezclaron volúmenes iguales (25 µl) de la estructura base de KLH con una concentración de 10 µg/ml (normalizada a la concentración de IgG), conjugado de HRP, 1 µg/ml, ácido ascórbico 600 mM en agua y muestra en un reactor. La mezcla se incubó con 100 µl de solución activadora A (es decir, una solución activadora) para iniciar la reacción quimioluminiscente. Tras el comienzo de la reacción quimioluminiscente, las muestras se leyeron en un luminómetro de microplacas SpectraMax® L en el modo de cinética de lectura rápida, y se registró la señal quimioluminiscente durante un período de tiempo de aproximadamente 0,12 a 0,21 segundos. Los resultados del inmunoensayo se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18.

[cTnI], ng/ml	RLU promedio
0	20.675
0,1	61.589
25,0	32.757.125

Ejemplo 8: Preparación de SBP marcado con quimioluminiscente incluida marca quimioluminiscente, micropartícula de estreptavidina y anticuerpo biotinilado

Este ejemplo describe preparación de micropartículas de proteína de estreptavidina marcada con AK1 mediante desolvatación. Tras el acoplamiento con un anticuerpo biotinilado, la partícula de estreptavidina se puede utilizar como estructura base para inmunoensayos.

A. Preparación de micropartículas de proteína

Se preparó estreptavidina marcada con AK1 como se describe en el Ejemplo 6. Se añadieron 9,8 mg (2 ml) de la estreptavidina marcada con AK1 a un vial de reacción de 4 ml y se agitó a una velocidad constante de 350 rpm utilizando una varilla de agitación de Teflon. A continuación, se añadieron 2,8 ml de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) gota a gota a una velocidad de 2 cm³/minuto (2 ml/minuto) hasta que la solución se volvió turbia. A continuación, se añadieron 12 µl de una solución de glutaraldeído al 5 % (Sigma-Aldrich; diluida en una relación 1:10 en agua destilada) a la reacción y se mezcló durante otros 60 minutos para reticular las subunidades de estreptavidina de las partículas formadas por desolvatación. La cantidad molar de glutaraldeído era igual al número de residuos lisina presentes en 9,8 mg de estreptavidina. A continuación, se añadieron 12 µl de una solución de etanolamina 0,832 M acuosa (Sigma-Aldrich) para interrumpir la reacción, seguido de la adición de 2,8 µl de una solución de Tween®-20 acuosa al 20 % para estabilizar las partículas.

Las partículas se colocaron en un casete de diálisis Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.) y se dializaron frente a PBS, pH 7,4 que contenía Tween-20 al 0,01 % a 4°C. El tampón de diálisis (1 l) se cambió dos veces en el transcurso de un período de 24 horas para retirar los subproductos de reacción. La concentración de estreptavidina de la solución de partículas se midió a continuación utilizando un kit de ensayos para proteínas con ácido bicineónico (BCA) comercial (núm. de producto 23227, ThermoScientific). Se utilizó estreptavidina SA-21 (E280=3,2 cm⁻¹ mg/ml-l) para preparar patrones a concentraciones conocidas y la concentración proteica de las partículas se calculó a partir de la curva estándar o de calibración.

Las partículas purificadas se analizaron mediante espectroscopía de correlación de fotones utilizando un analizador de tamaño de partículas submicrométrico y de potencial zeta nanométrico Delsa™ (Beckman Coulter) y se halló que tenían un diámetro promedio de aproximadamente 4 micrómetros. Modificando las condiciones descritas en la presente memoria (volumen de disolvente utilizado para desolvatar las partículas, pH de reacción, etc.), se puede lograr el tamaño de partículas deseado (~200 nm a 4 µm).

B. Ensayo para cTnI utilizando partículas de estreptavidina

Las partículas de estreptavidina con marcado de AK1 se recubrieron con anticuerpo anti-cTnI biotinilado en PBS a pH 7,4 y relación de 0,23 mg de IgG por mg de partículas. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave para dejar que la IgG biotinilada se acomplejara con las partículas de estreptavidina. Las partículas se centrifugaron a continuación a 10.000 x g durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante, que contenía IgG no unida. Se resuspendió el microgránulo de partículas en PBS, a pH 7,4, que contenía Tween-20 al 0,1 % hasta una concentración final de 100 µg/ml de estreptavidina.

Se preparó en diluyente de ensayo una mezcla que contenía 50 µg/ml de partículas de estreptavidina recubiertas con anticuerpo anti-cTnI a una concentración de 0,15 µg/ml, conjugado de peroxidasa de rábano picante, ácido ascórbico 375 µM y IgG a una concentración de 1 mg/ml (BCI artículo 270904). El ensayo se llevó a cabo añadiendo 70 µl de la mezcla de conjugado de HRP/partículas y 30 µl de cada muestra a un reactor. Se prepararon muestras de concentraciones de cTnI conocidas introduciendo cantidades conocidas de cTnI nativa (Scipac, Sittingbourne, Reino Unido) en suero humano normal, y se asignaron concentraciones de muestra a partir de los valores de dosis generados en el ensayo AccuTnI (Beckman Coulter). Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se realizó la lectura de las muestras en un luminómetro de microplacas SpectraMax® L (MDS Analytical Technologies) en el modo de lectura de cinética rápida. Para iniciar la reacción quimioluminiscente, se inyectó un volumen igual de Solución activadora A a una velocidad de 350 µl/s mientras se observaba la señal quimioluminiscente. Para analizar los datos se utilizó el programa informático SoftMax Pro. Los valores se indican como la suma de 20 puntos de datos (tiempo de integración 10 ms), comenzando 30 ms después de la iniciación de la quimioluminiscencia, y se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19.

[cTnl], ng/ml	RLU promedio
22,900	10.055.867
5,100	2.296.862
1,290	299.171
0,322	180.060
0,031	49.456
0,000	37.747

Ejemplo 9: Variación de concentraciones del componente de ensayo para ensayo de PSA con SBP marcado con quimioluminiscente incluida estructura base de dextrano y SSIA

Los siguientes ejemplos demuestran el inmunoensayo de un analito utilizando un sbp marcado con quimioluminiscente incluida una estructura base de dextrano soluble con marcado directo con compuesto quimioluminiscente y anticuerpo.

En este ejemplo, un miembro de un par de unión específica de anticuerpos monoclonales correspondientes a PSA se conjuga con una molécula de dextrano acoplada con AK1, como se describe a continuación en el Ejemplo 10, salvo que el anticuerpo es tiolado y unido covalentemente a dextrano con marcado de AK11 y activado con maleimida. El conjugado de anti-PSA-dextrano se suministró en una solución acuosa a 10 µg/ml, 2,5 µg/ml o 0,5 µg/ml como se indica en las tablas siguientes. Se conjugó un segundo anticuerpo de PSA monoclonal con HRP, como se ha descrito anteriormente y se suministró en una solución acuosa a una concentración de 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml o 0,03 µg/ml como se indica en las tablas siguientes.

Los ensayos se llevaron a cabo colocando 25 µl de muestra en cada uno de los dos reactores. A la muestra colocada en el primer reactor, se añadieron 25 µl de solución de Ab1, 25 µl de agua, 25 µl de solución de Ab2 y se incubó durante 15 minutos. En un segundo reactor se añadieron 25 µl de solución de Ab1, ácido ascórbico (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) en agua desionizada a las concentraciones de 200 o 500 µM (como se indica en la tabla siguiente), y 25 µl de solución Ab2 a 25 µl de muestra y se incubó durante 15 minutos. Después de la incubación, se inició la reacción quimioluminiscente en cada reactor mediante la inyección de 100 µl de solución activadora A. De forma simultánea a la inyección de la solución activadora en el reactor, se detecta la señal quimioluminiscente utilizando un luminómetro que incorpora un tubo fotomultiplicador de conteo de fotones (PMT) en el transcurso de 3,85 segundos y los datos se almacenan en un ordenador.

Se analizó cada muestra por triplicado según el método de ensayo anterior. Los datos de RLU recogidos para cada muestra sometida a ensayo durante el intervalo de tiempo de 495 milisegundos comenzando 82,5 milisegundos después del inicio de la introducción de la solución activadora al reactor se sumaron para cada ejecución individual, se promediaron utilizando los triplicados para cada muestra y se presentan en la Tabla 20. Se calculó una relación señal/ruido (S/S0) para cada valor de concentración. Los datos de la Tabla 20 se pueden utilizar para generar una curva de calibración para el análisis de muestras de concentración desconocida en PSA.

Se prepararon muestras de concentración conocida como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Cada muestra se analizó por triplicado según el método anterior.

Tabla 20

PSA, ng/ml	Sin SSIA		Con SSIA	
	RLU	S/S0	RLU	S/S0
0,0	222449	1,0	1756	1,0
0,4	186876	0,8	4393	2,5
1,4	150945	0,7	13337	7,6
7,0	243129	1,1	57119	32,5
51,0	946997	4,3	362044	206,2
101,6	1491153	6,7	604024	344,0

Los siguientes ensayos de demostración utilizan reactivos similares a los del ejemplo anterior. Se conjuga un miembro de un par de unión específica para PSA con una molécula de dextrano acoplada con AK1, y se suministra en una solución acuosa a una concentración de 10 µg/ml, 2,5 µg/ml o 0,5 µg/ml, como se indica en las tablas siguientes. Se conjuga un segundo anticuerpo de PSA monoclonal a HRP, como se ha descrito anteriormente y se suministra en una solución acuosa a una concentración de 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml o 0,03 µg/ml, como se indica en las tablas siguientes.

Cada muestra se analizó por triplicado según el siguiente método.

El ensayo se llevó a cabo colocando 25 µl de muestra en un reactor, añadiendo a continuación 25 µl de solución de Ab1, ácido ascórbico en agua a las concentraciones de 200 o 500 µM, como se indica en la tabla siguiente, y 25 µl de solución de Ab2, creando así una mezcla de reacción. El mezclado tuvo lugar solamente transfiriendo cada reactivo, seguido de incubación durante 15 minutos. Tras la incubación, se inicia la reacción quimioluminiscente en cada reactor mediante inyección de 100 µl de una solución activadora A y se detectó la luz generada por la reacción utilizando un luminómetro de conteo de fotones durante 3,85 segundos y los datos de RLU se almacenaron en un ordenador.

Los datos de RLU recogidos para cada muestra sometida a ensayo durante el intervalo de tiempo de 495 milisegundos comenzando 125 milisegundos después del inicio de la introducción de la solución activadora al reactor se sumaron para cada ejecución individual, se promediaron con las tres repeticiones para cada muestra y se presentan en las Tablas 21-23. Se calculó una relación señal/ruido (S/S0) y %CV para cada valor de concentración. Los datos de las tablas se pueden utilizar para generar una curva de calibración para análisis de muestras para la determinación de la concentración de PSA empleando los materiales y orientación de este ejemplo.

Los resultados del Ejemplo 9 demostraron que los inmunoensayos satisfactorios corresponden a concentraciones variables de sbp marcado con quimioluminiscente, sbp marcado con activador y SSIA, y diferentes relaciones de dichos reactivos. Los métodos del Ejemplo 9 son adecuados para usar en la determinación de la concentración de analitos en muestras desconocidas, incluida la generación de curvas de calibración para la determinación de la concentración de PSA según métodos estándar.

Tabla 21.

	Concentración de la solución de cada reactivo					
Dextrano-Ab1-AK1 ug/ml	10	10	10	10	10	10
AB2-HRP conj ug/ml	0,5	0,5	0,1	0,1	0,03	0,03
Ácido ascórbico uM	200	500	200	500	200	500
	Cantidad en reactor					
Ab de captura (ng)	250	250	250	250	250	250
HRP-conj (ng)	12,5	12,5	2,5	2,5	0,75	0,75
Ácido ascórbico Conc uM	50	125	50	125	50	125
Ácido ascórbico nMoles	5	12,5	5	12,5	5	12,5
PSA (ng/ml)	Suma RLU					
0,0	7.713	2.224	1.633	607	659	305
0,4	10.169	3.769	2.453	1.173	1.020	543
1,4	19.053	9.363	5.424	3.213	1.913	1.164
7,0	63.211	36.408	19.852	12.859	6.972	4.311
51,0	363.729	224.620	122.425	74.771	40.588	24.837
101,6	683.660	403.413	182.711	115.324	56.025	37.695
PSA (ng/ml)	S/S0					
0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,4	1,32	1,69	1,50	1,93	1,55	1,78
1,4	2,47	4,21	3,32	5,30	2,90	3,81
7,0	8,19	16,37	12,15	21,20	10,59	14,12
51,0	47,16	101,00	74,95	123,25	61,62	81,34
101,6	88,63	181,39	111,86	190,09	85,06	123,45

Tabla 22

	Concentración de la solución de cada reactivo					
Dextrano-Ab1-AK1 ug/ml	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
AB2-HRP conj ug/ml	0,5	0,5	0,1	0,1	0,03	0,03
Ácido ascórbico uM	200	500	200	500	200	500
	Cantidad en reactor					
Ab de captura (ng)	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
HRP-conj (ng)	12,5	12,5	2,5	2,5	0,75	0,75
Ácido ascórbico Conc uM	50	125	50	125	50	125

Ácido ascórbico nMoles	5	12,5	5	12,5	5	12,5
PSA (ng/ml)	Suma RLU					
0,0	1.860	623	463	211	224	111
0,4	3.973	2.132	1.261	800	461	332
1,4	11.417	6.659	3.780	2.359	1.239	852
7,0	49.103	31.767	17.005	10.921	5.420	3.903
51,0	386.671	229.809	105.745	72.211	36.383	22.780
101,6	695.365	434.443	164.713	114.544	50.955	34.411
PSA (ng/ml)	S/S0					
0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,4	2,14	3,42	2,73	3,80	2,06	3,00
1,4	6,14	10,69	8,17	11,20	5,53	7,70
7,0	26,40	51,02	36,76	51,84	24,20	35,27
51,0	207,89	369,07	228,56	342,77	162,42	205,84
101,6	373,85	697,71	356,01	543,72	227,48	310,94

Tabla 23.

Solución Conc.	Concentración de la solución de cada reactivo					
Dextrano-Ab1-AK1 ug/ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
AB2-HRP conj ug/ml	0,5	0,5	0,1	0,1	0,03	0,03
Ácido ascórbico uM	200	500	200	500	200	500
Cantidad en RV	Cantidad en reactor					
Ab de captura (ng)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
HRP-conj (ng)	12,5	12,5	2,5	2,5	0,75	0,75
Ácido ascórbico Conc uM	50	125	50	125	50	125
Ácido ascórbico nMoles	5	12,5	5	12,5	5	12,5
PSA (ng/ml)	Suma RLU					
0,0	425	156	127	77	76	57
0,4	2.455	1.403	820	543	305	223
1,4	8.292	5.135	2.740	2.004	1.091	727
7,0	41.265	24.752	14.593	9.851	4.912	3.396
51,0	411.059	277.775	115.507	73.619	34.512	21.580
101,6	766.601	564.197	170.416	113.653	47.253	30.481
PSA (ng/ml)	%CV					
0,0	6,8 %	5,1 %	1,8 %	10,8 %	0,0 %	17,6 %
0,4	16,2 %	1,4 %	4,8 %	3,8 %	8,0 %	11,0 %
1,4	2,5 %	2,2 %	5,6 %	0,3 %	2,8 %	3,9 %
7,0	4,8 %	2,0 %	4,0 %	0,1 %	4,3 %	3,7 %
51,0	3,0 %	2,8 %	1,2 %	8,0 %	2,3 %	4,2 %
101,6	7,2 %	3,3 %	2,9 %	2,9 %	1,5 %	3,0 %
PSA (ng/ml)	S/S0					
0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,4	5,77	8,99	6,47	7,02	4,02	3,88
1,4	19,50	32,91	21,63	25,91	14,35	12,67
7,0	97,02	158,67	115,21	127,38	64,63	59,23
51,0	966,44	1780,61	911,89	951,97	454,11	376,40
101,6	1802,35	3616,65	1345,39	1469,66	621,75	531,65

Ejemplo 10: Preparación de un SBP marcado con quimioluminiscente que incluye una marca quimioluminiscente, una estructura base de dextrano-estreptavidina, y un anticuerpo acoplado a biotina y su uso en ensayos de tni, ckmb o mioglobina con diferentes SSIA.

5

A. Marcado de dextrano modificado con amino con un compuesto quimioluminiscente y amina y un reticulante heterobifuncional reactivo de sulfhidrido:

Se disolvieron 5,2 mg de NHS-(PEO)8-Maleimida (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y 22,1 mg de AK1, un éster de acridano cetenoitioacetal-NHS, sal de amonio en DMSO a 30 mg/ml, se combinaron, y se añadieron a 35 mg de poliaminodextrano 70 kDa (Helix Research, n.º de producto 1209; 70 moles NH₂/mol de dextrano), disuelto en PBS, pH 7,2 a 14 mg/ml, en un reactor de polipropileno. La mezcla de reacción se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Los grupos amino sin reaccionar del poliaminodextrano se bloquearon incubando el conjugado con 10 µl de MS(PEG)8 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) durante 10 minutos más a temperatura ambiente en la oscuridad. El dextrano activado se clarificó mediante microcentrifugación (14 K x g, 1 min.) y se purificó en una columna de Sephadex G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.), equilibrada en PBS, pH 7,2 que contenía EDTA 1 mM, siguiendo las instrucciones del fabricante.

B. Tiolación de la estreptavidina:

Un exceso 50 veces molar (5,63 mg) de 2-iminotiolano (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) se añadió a 45 mg (10 mg/ml) de streptavidin-plus® (Prozyme, Hayward, CA, EE. UU.). Se añadió PBS, pH 7,4 (1 ml) a la mezcla para aumentar el pH de la reacción a 7,0. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos en la oscuridad. La estreptavidina tiolada se purificó en columnas Sephadex® G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.), equilibrada en PBS, pH 7,2 que contenía EDTA 1 mM, siguiendo las instrucciones del fabricante.

C. Conjugación de estreptavidina tiolada a dextrano derivatizado con AK y activado con maleimida.

A continuación, el dextrano activado (A) y la estreptavidina tiolada (B) se combinaron y se hicieron reaccionar durante la noche a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Los grupos maleimida y tiol sin reaccionar se bloquearon seguidamente en un proceso en dos etapas. En la primera etapa, se añadió un exceso (0,025X volumen de reacción) de L-cisteína-HCl 50 mg/ml (disuelta en PBS, pH 7,4) al conjugado y se incubó durante 15 minutos. En la segunda etapa, se añadió un exceso (0,04X volumen de reacción) de yodoacetamida 50 mg/ml (disuelta en PBS, pH 7,4) a la mezcla de reacción junto con borato 50 mM, pH 8,5 (0,08X volumen de reacción) y se incubó durante otros 15 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz.

D. Purificación del conjugado de estreptavidina-dextrano-AK1

El conjugado se clarificó mediante microcentrifugación (14 K x g, 2 min.) y se purificó en una columna Superdex® 200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) equilibrada en PBS, pH 7,4 en un sistema System Gold® HPLC (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, EE. UU.) con una bomba de gradiente binario 125 y un detector de matriz de diodos 168 en un recopilador de fracciones Gilson FC 203B. El caudal programado fue 1 cm³/min. (1 ml/min.); volumen del bucle de inyección de la muestra - 1 ml; fraccionamiento, 1 ml/fracción). Las fracciones de conjugado se combinaron cuidadosamente para excluir una pequeña cantidad de estreptavidina sin reaccionar que se eluye después del conjugado. La concentración de estreptavidina en el conjugado combinado se determinó con el ensayo de la proteína BCA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), usando streptavidin plus® a concentraciones predeterminadas como patrones. La concentración de AK1 se determinó espectrofotométricamente (E384=13,6 mg- 1 ml⁻¹). La concentración de estreptavidina calculada y la relación molar AK:estreptavidina del combinado de conjugado fue 1,47 mg/ml y 18:1, respectivamente.

E. Biotinilación de anticuerpos monoclonales xPSA

Los anticuerpos PSA biotinilados se prepararon añadiendo un exceso 6 veces molar de NHS-(PEO)4-biotina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), disuelta en DMSO hasta 2 mg/ml, hasta 6 mg de anticuerpo MxPSA (7,6 mg/ml en PBS, pH 7,4). Después de una incubación de 60 min. a temperatura ambiente, el anticuerpo biotinilado se purificó sobre una columna de Sephadex G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.), equilibrada en PBS, pH 7,4, siguiendo las instrucciones del fabricante.

F. Acoplamiento del anticuerpo biotinilado a conjugados de estreptavidina-dextrano-AK

Se realizó el acoplamiento incubando el conjugado de estreptavidina-dextrano-AK (1,47 µg/ml) con monoclonal anti-PSA biotinilado (2 µg/ml) en diluyente (Tris 100 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween®-20 al 0,2 %, EDTA 0,1 mM, BSA al 1 %) durante 30 minutos. Esto corresponde a una relación molar 2:1 de estreptavidina:anticuerpo biotinilado.

G. Ensayo de Tnl, CKMB o mioglobina con SBP marcado con quimioluminiscente de estructura base de dextrano y SSIA

65

Este ejemplo demuestra métodos de ensayo para detectar un analito, tal como Troponina I, CKMB o mioglobina. Para cada ensayo, el par de unión específica utilizado es una pareja de anticuerpos monoclonales, cada anticuerpo específico de un sitio antigénico diferente en el analito especificado. Para cada ensayo, un primer anticuerpo se biotiniló y se conjugó a una estructura base de dextrano-AK1 estreptavidina ("estructura base Ab"), preparada por métodos similares a los descritos en el Ejemplo 5, y proporcionados en una solución acuosa a 0,5 µg/ml o 2 µg/ml. Un segundo anticuerpo para cada ensayo se conjugó con HRP como se ha descrito anteriormente, ("conjugado HRP") y se suministró a 0,25 µg/ml o 1 µg/ml en solución acuosa (Tris 100 mM, NaCl 150 mM pH 8,0, Tween20 al 0,2 %, EDTA 0,1 mM, BSA al 1 %).

Cada ensayo se llevó a cabo añadiendo 25 µl de la estructura base Ab, 25 µl de ácido ascórbico 600 µM en agua, 25 µl de muestra y 25 µl de conjugado HRP a un recipiente de reacción. La mezcla de reacción se incubó durante 15 min. a 37 °C. El reactor se introdujo en un luminómetro para detección, a continuación se añadieron 100 µl de solución activadora A y la intensidad de luz se registró durante un periodo de tiempo de varios segundos. Los datos recogidos en el luminómetro correspondientes a un tiempo transcurrido de 302,5 milisegundos aproximadamente centrados en la señal pico se sumaron, se promediaron a tres ciclos por muestra y se presentaron en la Tabla 24-26. Se calculó para cada muestra la relación entre la señal y el ruido.

Los resultados de este ejemplo demuestran la aplicación de los ensayos de la presente a otros analitos. Además, el ejemplo demuestra satisfactoriamente ensayos que utilizan diferentes concentraciones e intervalos de reactivos para sbp marcado con quimioluminiscente, sbp marcado con activador, y SSIA. Los métodos del Ejemplo 7 son adecuados para usar en la determinación de una concentración de analito en muestras desconocidas, incluida la generación de curvas de calibración para determinar la concentración de Tnl, CKMB o mioglobina según métodos normalizados.

Tabla 24. Tnl

Estructura base Ab µg/ml		0,5		0,5		2		2	
Conj. HRP µg/ml		0,25		1		0,25		1	
Ácido ascórbico µM		600		600		600		600	
Cal.	Tnl ng/ml								
		URL	S/S0	URL	S/S0	URL	S/S0	URL	S/S0
S0	0	53		71		95		171	
S1	0,17	72	1,4	112	1,6	152	1,6	329	1,9
S2	0,37	116	2,2	169	2,4	201	2,1	481	2,8
S3	1,37	236	4,4	345	4,9	547	5,8	1.029	6,0
S4	11,1	1743	32,7	3165	44,8	1203	12,7	8.697	51,0
S5	27,9	4863	91,2	8371	118,5	7813	82,5	22.883	134,1
S6	106	25494	478,0	47372	670,4	54992	580,9	125.264	734,0

Tabla 25. CKMB

Estructura base Ab µg/ml		0,5		0,5		2		2	
Conj. HRP µg/ml		0,25		1		0,25		1	
Ácido ascórbico µM		600		600		600		600	
Cal.	CKMB ng/ml								
		URL	S/S0	URL	S/S0	URL	S/S0	URL	S/S0
S0	0,6	72		120		113		264	
S1	3,2	92	1,3	143	1,2	160	1,4	404	1,5
S2	9,6	111	1,5	247	2,1	231	2,0	700	2,7
S3	29,2	179	2,5	451	3,8	448	4,0	1499	5,7
S4	109,4	523	7,3	1635	13,6	1593	14,1		
S5	315,8	1953	27,1	6641	55,3	5977	52,7	21517	81,5

Tabla 26. Mioglobina

Estructura base Ab µg/ml		0,5		0,5		2		2	
Conj. HRP µg/ml		0,25		1		0,25		1	
Ácido ascórbico µM		600		600		600		600	
Cal.	Mio ng/ml								
		URL	S/S0	URL	S/S0	URL	S/S0	URL	S/S0

S1	11,4	45		113		159		361	
S2	57,2	11328	250	36861	325	43469	274	119387	330
S3	219	52303	1.154	328599	2.899	171988	1.084	990660	2.742
S4	830	70411	1.553	481109	4.245	220796	1.392	1507591	4.172

Los ensayos se llevaron a cabo usando un instrumento de inmunoensayo automatizado modificado Dxl® (Beckman Coulter), como se ha descrito anteriormente.

5 H. Ensayos que utilizan varios SSIA en un ensayo de Tnl

Se demostraron múltiples niveles de concentración de 5 SSIA diferentes en el contexto del sistema de ensayo Tnl según la presente descripción. Soluciones madre de ácido ascórbico concentradas, TROLOX, fenoxazina, 3-aminotirosina, y 2-aminofenol, todos disponibles de Sigma Aldrich, se prepararon en agua desionizada a 100 mM.

En un tubo de reacción, 400 µl de anticuerpo-HRP Tnl M6 conjugado a 0,5 µg/ml en solución acuosa tamponada a pH 8,0 (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,1 mM, Tween-20 al 0,2 % y BSA al 1 %), 400 µl de AK1~Dex70/31~Estreptavidina (fracción 1) 2:1 SA/Ab a 2 µg/ml de Ab también en solución acuosa tamponada a pH 8,0, y 400 µl de solución de patrón de calibrador que contenía el analito Tnl a concentraciones conocidas. Se preparó un tubo para cada concentración de calibrador. Se suministraron 75 µl de la solución premezclada de conjugado Ab-HRP, la estructura base y los patrones mediante octapéptido al interior de cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de polipropileno Coming/Sostar de 96 pocillos (blanco, catálogo Corning, n.º 3355) y se dejó incubar durante 38 -49 minutos a temperatura ambiente. A continuación, 25 µl de cada antioxidante, en forma de una solución concentrada de 2 mM, 1 mM o 0,5 mM, se pipetearon a los pocillos de la placa usando una pipeta de repetición. Las placas se hicieron girar durante 10 segundos para mezclar y se incubaron de 5 a 33 minutos. La detección se llevó a cabo con un luminómetro de placa de inyección SpectraMax L. Se tomaron las lecturas iniciales, seguido de la inyección de 100 µl de Solución activadora A a cada pocillo, y lectura de la señal quimioluminiscente.

Tabla 27: Relación entre señal y ruido y concentración final de SSIA en la mezcla de reacción incluido el volumen de la solución activadora.

	DiH2O (control)			Ácido ascórbico			Trolox		
Señal/ruido				500 µM	250 µM	125 µM	500 µM	250 µM	125 µM
S0/S0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
S1/S0	0,9	1,1	1,2	1,3	1,6	1,4	1,7	2,0	1,6
S2/S0	1,0	1,1	1,2	1,8	2,6	2,7	2,6	3,5	3,3
S3/S0	1,4	1,8	1,9	5,1	8,2	8,5	11,3	12,8	11,5
S4/S0	3,2	4,0	4,2	15,4	28,7	32,2	31,1	45,8	44,4
S5/S0	17,4	20,6	25,7	87,5	188,5	228,0	192,0	295,1	302,0
S6/S0	139,8	200,3	283,2	562,4	1511,1	2196,3	1181,7	2334,5	2713,1
	Fenoxazina			3-Aminotirosina			2-Aminofenol		
	25 µM	12,5 µM	6,25 µM	500 µM	250 µM	125 µM	500 µM	250 µM	125 µM
S0/S0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
S1/S0	1,3	1,5	1,5	1,1	1,7	1,5	1,3	0,9	1,4
S2/S0	1,6	2,3	3,1	1,9	2,7	2,8	1,8	1,7	2,3
S3/S0	3,7	6,4	8,4	5,9	8,1	9,0	4,8	4,5	7,6
S4/S0	12,1	24,5	32,1	19,8	31,1	32,2	10,8	15,4	27,2
S5/S0	62,8	147,2	227,2	118,6	217,9	234,8	52,5	101,7	183,7
S6/S0	387,3	1116,9	2049,8	766,3	1772,4	2268,7	329,9	739,1	1604,7

Conclusión: Todos los SSIA analizados en este formato de ensayo de Tnl en fase de solución se comportaron eficazmente en la mejora entre la señal y el ruido.

Ejemplo 11: Preparación de un SBP marcado con quimioluminiscente que incluye una marca quimioluminiscente, una estructura base PAA, y un anticuerpo acoplado con estreptavidina-biotina

Este ejemplo describe la formación de una estructura base que tiene una cadena principal de poli(ácido acrílico) acoplada con estreptavidina y conjugada con un anticuerpo biotinilado. El ejemplo también describe el inmunoensayo de un analito usando la estructura base de PAA

A. Marcado de poli(ácido acrílico) (PAA) con el compuesto quimioluminiscente y biotina:

Se disolvieron 2 mg de sal sódica de poli(ácido acrílico) (PAA) (Polysciences, Warrington, PA, EE. UU.) en 0,4 ml de MES 100 mM, pH 6,0. Se disolvieron cincuenta (50) equivalentes molares (20 mg) de EDC (Thermo Scientific) y 6 mg de N-hidroxisulfosuccinimida (Thermo Scientific) en agua desionizada y se añadieron a la solución de PAA, mientras se mezclaban para activar los grupos carboxilato. Tras 20 minutos de activación, 50 equivalentes molares (0,843 mg) de biotina-PEG4-hidrazida (Thermo Scientific), y 50 equivalentes molares (1,01 mg) de AK1-hidrazida preparada en DMSO anhidro, se añadieron a la solución de PAA y se dejaron reaccionar durante la noche a temperatura ambiente con mezclado. El PAA marcado se purificó mediante intercambio de tampón en PBS, pH 7,2 usando un concentrador de centrifuga MWCO de 10 kDa (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) y se restauró al volumen original en PBS tras cinco (5) intercambios. El PAA marcado con biotina y AK1 se designó como PAA-B.

B. Acoplamiento del PAA marcado con estreptavidina

Una solución de 0,75 mg/ml de PAA marcado con biotina y AK1 (PAA-B) se preparó en PBS, pH 7,4. Se mezclaron 100 µl de PAA-B con 13,75 µl de una solución de 10 mg/ml de estreptavidina (Prozyme, Hayward, CA, EE. UU.), correspondiente a una relación molar 2:1 de estreptavidina:PAA, y la mezcla se incubó durante la noche a 4 °C.

C. Acoplamiento de los anticuerpos biotinilados al conjugado estreptavidina-PAA para formar la estructura base final

Los anticuerpos se biotinilaron como se demuestra en los ejemplos anteriores. La estructura base de PAA se formó acoplando el conjugado estreptavidina-PAA-B con el anticuerpo, incubando el conjugado estreptavidina-PAA-B con anti-cTnI biotinilado a 4 °C durante la noche. Las relaciones molares estreptavidina:anticuerpo variaron de 1:1 a 1:4.

D. Inmunoensayo para TnI con la estructura base de PAA

Las estructuras bases de PAA son útiles en métodos de ensayo para detectar un analito tal como cTnI, como se describe en el Ejemplo 6. Un primer anticuerpo para TnI se conjugó con una estructura base de PAA-AK1 estreptavidina, preparada como se ha descrito anteriormente, y se proporcionó en una solución acuosa a 2 µg/ml. A continuación, un segundo anticuerpo se conjugó con HRP y se proporcionó a 0,5 µg/ml en una solución acuosa, como se describe en el Ejemplo 2.

El inmunoensayo se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 17. En resumen, volúmenes iguales de la estructura base de PAA, conjugado HRP, 600 µM de ácido ascórbico en agua y la muestra de analito se mezclaron entre sí en placas de microtitulación de 96 pocillos.

Las muestras de cTnI se prepararon añadiendo cantidades conocidas de troponina I cardiaca natural (Scipac; Sittingbourne, Reino Unido) a suero humano normal, como se describe en el Ejemplo 6. En resumen, concentraciones conocidas de TnI se añadieron a suero humano normal, y se analizaron según el ensayo anteriormente descrito. Los datos se pueden usar para generar una curva de calibración para el análisis de TnI a concentraciones desconocidas.

Tabla 28.

PAA-B				
		Entrada	AK1:biotina 50/50	
		Muestra B-1		
		Entrada 2 SA/PAA		
		b Salida 2 SA/PAA		
	Btn-Aby/SA Entrada	1:1	1:2	1:4
	Tri ng/ml	Media	Media	Media
S0	0	3.574	4.446	5.884
S1	0,1	5.492	4.620	7.191
S2	0,22	7.540	7.889	9.457
S3	0,82	14.731	14.295	20.570
S4	2,3	35.257	42.840	48.462
S5	9,2	136.677	144.827	184.274
S6	41	623.412	624.243	801.758
S7	190	2.259.096	2.303.353	2.773.923
		%CV	%CV	%CV
S0	0	--	13,9 %	5,2 %

S1	0,1	11,2 %	29,3 %	7,7 %
S2	0,22	15,5 %	5,5 %	3,3 %
S3	0,82	20,9 %	17,2 %	-
S4	2,3	13,5 %	4,5 %	13,0 %
S5	9,2	13,9 %	7,4 %	3,5 %
S6	41	1,9 %	0,9 %	1,4 %
S7	190	2,4 %	0,5 %	2,5 %
		S/S0	S/S0	S/S0
S0	0	1,00	1,00	1,00
S1	0,1	1,54	1,04	1,22
S2	0,22	2,11	1,77	1,61
S3	0,82	4,12	3,22	3,50
S4	2,3	9,86	9,64	8,24
S5	9,2	38,24	32,58	31,32
S6	41	174,42	140,41	136,26
S7	190	632,07	518,10	471,45

b: La salida (relación molar de SA:PAA) se calculó mediante análisis realizado por cromatografía de exclusión molecular, usando estreptavidina como patrón.

5 **Ejemplo 12: Preparación de un SBP marcado con quimioluminiscente, una estructura base PAA, y anticuerpo tiolado**

Este ejemplo describe la preparación de una estructura base de PAA marcada con AK1 y maleimida usando química de EDC y conjugada con el anticuerpo monoclonal anti-Tnl (284) mediante una reacción tiol-maleimida. El ejemplo también demuestra el inmunoensayo de un analito usando la estructura base de PAA.

A. Marcado de PAA con compuesto quimioluminiscente y reticulante heterobifuncional

Se preparó PAA marcado con AK1 y maleimida (peso mol. aprox. 225.000) como se describe en el Ejemplo 11, salvo que 20 equivalentes molares de (N-hidrazida del [ácido k-maleimidoundecanoico]) (Thermo Scientific), y 20 equivalentes molares de AK2, preparados en DMSO anhidro, se añadieron a la solución de PAA y se dejaron reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente con mezclado. El PAA marcado se purificó mediante diálisis contra PBS, pH 7,2 usando casetes de diálisis MWCO Slide-A-Lyzer® de 10 kDa (Thermo Scientific). La concentración final de PAA fue 1,4 mg/ml, suponiendo que no se produjo pérdida de polímero durante la diálisis.

B. Tiolación del anticuerpo monoclonal anti-Tnl (284)

El anticuerpo monoclonal anti-Tnl (284) se dializó contra MES 100 mM, tampón pH 6,0 antes de usar. El reactivo de Traut (2-iminotiolano·HCl) (Thermo Scientific) se disolvió en agua desionizada a una concentración de 2 mg/ml. Se hicieron reaccionar 6,4 mg del anticuerpo a una concentración de 3,2 mg/ml con 2,36 µl de 2-iminotiolano (10 equivalentes molares por equivalente de anticuerpo) durante 1 hora, a temperatura ambiente. El anticuerpo tiolado se purificó usando columnas de desalación PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) equilibradas con PBS, pH 7,2, y que contenían EDTA 1 mM.

C. Acoplamiento del anticuerpo tiolado con PAA marcado con AK1 y maleimida

Se mezcló inmediatamente 105 µl de solución de PAA marcado con AK1 y maleimida, a una concentración de 1,4 mg/ml, con 0,6 mg de anticuerpo monoclonal anti-Tnl (284) tiolado, a una concentración de 3,8 mg/ml, correspondiente a 6 equivalentes de anticuerpo por equivalente de PAA. La reacción se llevó a cabo a 4 °C, y el producto de reacción se purificó mediante HPLC de exclusión por tamaño. Las fracciones de HPLC individuales del máximo del producto (denotadas como Fr3, Fr4 y Fr5 en la Tabla 29) se evaluaron en el inmunoensayo.

D. Inmunoensayo para el anticuerpo monoclonal anti-Tnl con la estructura base de PAA

Se llevó a cabo un ensayo para el anticuerpo monoclonal anti-Tnl usando la estructura base de PAA marcada con AK1 y maleimida como se describe en el Ejemplo 20. En resumen, volúmenes iguales de la estructura base de PAA marcada con AK1 y maleimida, conjugado HRP, ácido ascórbico 600 µM en agua y muestra se mezclaron entre sí en un reactor durante 30 minutos. La mezcla se incubó con 100 µl de solución activadora A, es decir, una solución activadora para iniciar la reacción quimioluminiscente. Tras el inicio, se leyeron las muestras en un luminómetro SpectraMax® L para microplaca en el modo de lectura cinética rápida, y se registró la señal quimioluminiscente durante un período de tiempo de

aproximadamente 0,12 a 0,21 segundos. Para cada muestra, se recogieron cinco (5) lecturas iniciales antes de iniciar mediante la adición de la solución activadora. Los valores indicados en la Tabla 29 son la suma de varios puntos de datos.

Tabla 29.

		PAA-B			
		PAA-B sin purificar	Purificado mediante HPLC		
			Fr3	Fr4	Fr5
Tnl ng/ml			URL promedio		
S0	0	10.808	9.733	9.821	11.971
S1	0,1	12.857	19.001	15.341	14.731
S2	0,22	16.997	23.737	22.343	20.105
S3	0,82	38.482	64.065	51.049	35.388
S4	2,3	165.357	341.500	242.947	175.005
S5	9,2	512.474	1.018.277	729.631	504.771
S6	41	2.692.899	5.704.473	4.617.038	3.186.736
S7	190	9.635.260	19.995.274	14.644.731	9.579.212
		S/S0			
S0	0	1,00	1,0	1,00	1,00
S1	0,1	1,19	1,95	1,56	1,23
S2	0,22	1,57	2,44	2,28	1,68
S3	0,82	3,56	6,58	5,20	2,96
S4	2,3	15,30	35,09	24,74	14,62
S5	9,2	47,41	104,62	74,30	42,17
S6	41	249,15	586,07	470,14	266,22
S7	190	891,46	2054,29	1491,23	800,23

Ejemplo 13: Preparación de un SBP marcado con quimioluminiscente que incluye una marca quimioluminiscente, polímero autoensamblable, y un anticuerpo acoplado con estreptavidina-biotina

- 10 En los ejemplos siguientes, la estreptavidina marcada con AK1 se mezcló con poli(ácido acrílico) (PAA) biotinilado, y los complejos de polímero se forman mediante autoensamblado. Estos polímeros autoensamblantes funcionan como materiales de estructura base para el inmunoensayo de un analito.

A. Preparación de PAA biotinilado

- 15 La estreptavidina marcada con AK1 y el anticuerpo monoclonal cTnl 284 biotinilado se prepararon según los métodos descritos en el Ejemplo 6.

- 20 Se disolvieron 200 mg de la sal sódica de poli(ácido acrílico) 225 kDa en 70 ml de MES 100 mM, pH 6,0. Para activar los grupos carboxilato, 2 g de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y 0.9 g de N-hidroxisulfosuccinimida se disolvieron en 10 ml de agua desionizada y se añadieron a la solución de PAA con mezclado. Tras 20 minutos de activación, 45 mg de biotina-PEG4-hidrazida, preparada a una concentración de 2,25 mg/ml en DMSO anhidro, se añadieron a la solución de PAA y se dejó mezclar durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, el PAA biotinilado se dializó ampliamente contra agua desionizada para eliminar los subproductos de la reacción. Tras la diálisis, el polímero biotinilado se secó en un concentrador SpeedVac® al vacío (Thermo/Savant) y el polímero seco (110 mg) se disolvió en PBS, pH 7,2 a una concentración de 2 mg/ml. La relación molar biotina:PAA (25 biotina:PAA) se determinó usando un kit de ensayo comercial HABA (Thermo Scientific).

- 30 **Ejemplo 14: Preparación de un SBP marcado con quimioluminiscente que incluye una marca quimioluminiscente, un polímero autoensamblante con PAA.**

- 35 En este ejemplo, el ácido poliacrílico (PAA) biotinilado se utiliza para finalizar la reacción de polimerización para los complejos de polímero formados mediante autoensamblado, como se describe en el Ejemplo 6, y para estabilizar los polímeros después de la formación. En resumen, los anticuerpos biotinilados se ensamblan con estreptavidina marcada con AK1 (como se describe anteriormente) a una relación molar optimizada. El ácido poliacrílico (PAA) biotinilado se añade a continuación para estabilizar el polímero autoensamblado.

A. Preparación de los polímeros autoensamblados

Se mezcló IgG biotinilada, a una concentración de 2,66 mg/ml con estreptavidina marcada con AK1, a una concentración de 0,584 mg/ml, y se preparó como se describe en el Ejemplo 7. Se dejaron incubar varias relaciones de IgG:estreptavidina marcada con AK1, de 0,25 a 1,25, y las mezclas durante la noche a 4 °C para permitir el autoensamblado.

B. Preparación de construcciones híbridas

Las construcciones autoensambladas se dividieron en volúmenes iguales, y se añadió PAA biotinilada, en varias relaciones molares de PAA:estreptavidina, de 0 a 1. La reacción se llevó a cabo a 4 °C y se incubó durante la noche para formar construcciones estables híbridas de PAA.

C. Inmunoensayo con la estructura base de PAA híbrida

Se llevó a cabo un ensayo para el anticuerpo monoclonal anti-TnI usando la estructura base de PAA híbrida como se describe en el Ejemplo 11. En resumen, volúmenes iguales de la estructura base de PAA, conjugado HRP, ácido ascórbico 600 mM en agua y muestra se mezclaron entre sí en un recipiente de reacción. La mezcla se incubó con solución activadora A, es decir, una solución activadora para iniciar la reacción quimioluminiscente. Tras el comienzo de la reacción quimioluminiscente, las muestras se leyeron en un luminómetro de microplacas SpectraMax® L en el modo de cinética de lectura rápida, y se registró la señal quimioluminiscente durante un período de tiempo de aproximadamente 0,12 a 0,21 segundos. Los resultados del inmunoensayo se muestran en las Tablas 30A-30E.

Tabla 30A.

	0,25 IgG/SA				
	0 SA/PAA	1 SA/PAA	3 SA/PAA	5 SA/PAA	8 SA/PAA
[TnI] (ng/ml)	URL promedio				
0	4.184	12.552	11.331	8.499	6.145
0,1	5.840	10.503	12.116	7.278	8.194
0,22	6.058	17.389	21.921	14.556	10.590
0,82	16.343	38.439	59.271	36.347	26.149
2,3	36.477	113.140	162.263	114.143	80.147
9,2	142.955	457.276	700.534	460.856	326.085
41	783.310	2.476.519	4.488.906	2.856.273	2.580.275
190	3.167.727	10.178.765	21.747.411	15.590.607	12.600.311
	S/S0				
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,1	1,40	0,84	1,07	0,86	1,33
0,22	1,45	1,39	1,93	1,71	1,72
0,82	3,91	3,06	5,23	4,28	4,26
2,3	8,72	9,01	14,32	13,43	13,04
9,2	34,17	36,43	61,82	54,23	53,06
41	187,20	197,31	396,15	336,09	419,88
190	757,06	810,95	1.919,23	1.834,48	2.050,39

Tabla 30B

	0,5 IgG/SA				
	0 SA/PAA	1 SA/PAA	3 SA/PAA	5 SA/PAA	8 SA/PAA
[TnI] (ng/ml)	URL promedio				
0	4.010	5.884	7.540	8.019	6.538
0,1	4.620	8.106	11.375	11.201	9.588
0,22	6.799	11.811	14.992	22.488	21.006
0,82	14.687	31.378	52.603	67.028	57.876
2,3	50.685	104.118	148.838	249.794	204.284
9,2	188.943	417.949	603.279	1.170.506	1.092.619
41	1.221.385	2.765.122	6.039.909	15.913.289	15.048.299
190	6.571.327	15.707.578	96.187.150	205.809.423	156.927.524

	S/S0				
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,1	1,15	1,38	1,51	1,40	1,47
0,22	1,70	2,01	1,99	2,80	3,21
0,82	3,66	5,33	6,98	8,36	8,85
2,3	12,64	17,70	19,74	31,15	31,25
9,2	47,12	71,03	80,01	145,96	167,13
41	304,59	469,95	801,06	1.984,38	2.301,82
190	1.638,76	2.669,60	12.757,11	25.664,37	24.004,00

Tabla 30C

	0,75 IgG/SA				
	0 SA/PAA	1 SA/PAA	3 SA/PAA	5 SA/PAA	8 SA/PAA
[Tnl] (ng/ml)	URL promedio				
0	7.366	8.019	7.801	9.196	9.893
0,1	10.590	11.811	13.075	16.343	14.818
0,22	22.183	25.495	28.981	35.649	40.095
0,82	73.087	79.580	112.182	131.969	144.261
2,3	285.152	259.992	363.097	445.898	573.885
9,2	2.447.372	1.372.384	2.049.153	2.620.363	3.844.405
41	43.338.476	13.828.384	33.016.180	59.347.317	89.147.402
190	168.827.565	79.333.148	184.698.375	304.942.403	279.613.531
	S/S0				
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,1	1,44	1,47	1,68	1,78	1,50
0,22	3,01	3,18	3,71	3,88	405
0,82	9,82	9,92	14,38	14,35	14,58
2,3	38,71	32,42	46,54	48,49	58,01
9,2	332,27	171,14	262,67	284,95	388,59
41	5.883,92	1.724,40	4.232,10	6.453,66	9.010,98
190	22.921,17	9.892,82	23.675,12	33.160,62	28.263,20

Tabla 30D

	1 IgG/SA				
	0 SA/PAA	1 SA/PAA	3 SA/PAA	5 SA/PAA	8 SA/PAA
[Tnl] (ng/ml)	URL promedio				
0	9.457	6.843	8.194	8.586	9.152
0,1	19.481	13.815	14.948	18.217	18.696
0,22	49.203	36.870	41.969	51.252	48.593
0,82	168.105	91.086	119.984	139.685	138.246
2,3	627.056	430.593	564.030	695.181	704.733
9,2	4.694.988	1.736.105	2.366.367	3.202.127	3.633.556
41	91.062.483	17.583.497	35.058.831	58.755.998	70.824.415
190	331.954.679	132.619.201	293.094.757	375.459.073	375.947.567
	S/S0				
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,1	2,06	2,02	1,82	2,12	2,04
0,22	5,20	5,39	5,12	5,97	5,31
0,82	17,77	13,31	14,64	16,27	15,11
2,3	66,30	62,93	68,84	80,97	77,00
9,2	496,44	253,72	288,81	372,96	397,01
41	9.628,70	2.569,70	4.278,81	6.843,39	7.738,39
190	35.099,97	19.381,36	35.771,23	43.730,22	41.076,66

Tabla 30E

	1,25 IgG/SA				
	0 SA/PAA	1 SA/PAA	3 SA/PAA	5 SA/PAA	8 SA/PAA
[Tnl] (ng/ml)	URL promedio				
0	11.506	6.407	9.065	10.068	6.450
0,1	25.626	13.467	16.735	16.256	14.295
0,22	58.835	30.202	34.909	38.177	22.837
0,82	207.685	85.595	103.378	104.467	67.074
2,3	872.612	363.237	493.264	499.806	311.519
9,2	10.022.572	1.959.241	2.419.036	3.012.092	1.637.333
41	148.756.072	27.487.732	40.916.313	50.923.490	15.755.349
190	459.829.313	135.376.541	230.820.255	242.615.955	55.732.378
	S/S0				
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,1	2,23	2,10	1,85	1,61	2,22
0,22	5,11	4,71	3,85	3,79	3,54
0,82	18,05	13,36	11,40	10,38	10,40
2,3	75,84	56,70	54,41	49,65	48,29
9,2	871,10	305,81	266,85	299,19	253,83
41	12.928,95	4.290,39	4.513,57	5.058,20	2.445,64
190	39.965,50	21.130,07	25.462,28	24.098,88	8.640,14

5 Ejemplo 15: Preparación de un SBP marcado con quimioluminiscente que incluye una marca quimioluminiscente, conjugado HRP polimérico y anticuerpo acoplado con estreptavidina-biotina

Este ejemplo demuestra la preparación de conjugados poliméricos de IgG y la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) y su uso como materiales de estructura base para inmunoensayos en fase de solución.

10 A. Preparación del conjugado HRP-IgG

Para la oxidación con peryodato de la enzima, HRP se disolvió en agua a una concentración de 10 mg/ml. Se añadieron 100 µl de peryodato de sodio 0,088 M recientemente preparado a HRP con agitación a 4 °C y se dejaron reaccionar durante el tiempo adecuado (es decir, de 20 a 40 minutos). La reacción de oxidación se inactivó mediante la adición de un diol, tal como etilenglicol, y se dejó incubar durante 20 minutos más a 4 °C. La enzima oxidada se desaló en una columna PD10 y se eluyó en el tampón de reacción adecuado, tal como PBS, para separar la enzima del exceso de reactivos de oxidación e inactivación.

Se prepararon conjugados de HRP oxidada con IgG mediante aminación reductora. La IgG se mezcló con HRP oxidada en una relación 1:1 en volumen, y una relación molar de 1: 4-15 IgG a HRP. La mezcla se dejó reaccionar durante dos horas a toda la noche a temperatura ambiente. Se añadieron 10 µl de borohidruro 5 M, y se dejaron reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. El producto de reacción se dializó o se separó mediante desalación para eliminar el exceso de reactivo reductor. A continuación, el producto se separó aplicando el conjugado a una columna SE HPLC y recogiendo los conjugados con un peso molecular entre 450 y 1500 KDa. Se evaluaron las relaciones HRP:IgG, y se analizaron los conjugados en un inmunoensayo normalizado SPARCL en fase solución SpectraMax®.

Los inmunoensayos de un analito específico, tales como la Troponina I cardíaca (cTnI), se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 11 usando el conjugado A, B, o C como se describe a continuación. En resumen, volúmenes iguales de IgG (33 µg/ml), el conjugado HRP A, B, o C (5 mg/ml), ácido ascórbico 500 µM en agua, y muestra se mezclaron entre sí en placas de microtitulación de 96 pocillos. La mezcla se incubó con solución activadora A, es decir, una solución activadora para iniciar la reacción quimioluminiscente. Para estos ensayos, el anticuerpo monoclonal cTnI M06 se desaló en tampón bicarbonato 100 mM pH 9,6 con una concentración final de 1-10 mg/ml. La Tabla 31 muestra los resultados del inmunoensayo para cTnI usando los conjugados HRP poliméricos A, B, o C. Estos conjugados se prepararon prácticamente como se describe a continuación:

B. Preparación del anticuerpo monoclonal cTnI para conjugación con el HRP oxidado

Antes de la conjugación con el HRP oxidado, el anticuerpo monoclonal cTnI se intercambió en tampón con cualquiera de PBS, pH 7,2 (Conjugados A&B) o carbonato de sodio, pH 9,6 (Conjugado C).

C. Conjugado A y B: Oxidación de HRP

HRP se disolvió en agua a 5 mg/ml. Se añadieron 100 µl de peryodato de sodio recientemente preparado a una concentración de 8,74 mg/ ml (0,088 M) a cada mililitro de HRP con agitación a 4 °C. La mezcla se dejó reaccionar durante el tiempo adecuado. Para el conjugado A, el tiempo de reacción fue de aproximadamente 20 minutos, y para el conjugado B, de aproximadamente 40 minutos. Para cada 5 mg de HRP, se añadieron 17 µl de etilenglicol y se incubaron durante 20 minutos más a 4 °C para inactivar la reacción de oxidación.

Se desaló 1,0 ml de enzima oxidada en una columna PD10 equilibrada en PBS pH 7,2 para eliminar el exceso de reactivos de oxidación e inactivación.

D. Conjugación con IgG

Para los conjugados A y B, se hicieron reaccionar 2,5 mg de HRP oxidada con 0,4695 ml (2,5 mg) de IgG. Se dejó que los conjugados reaccionaran durante la noche. Se prepararon recientemente 10 µl de borohidruro potásico 4 mg/ml, y se añadieron 10 µl de esta solución a cada mililitro de la mezcla de reacción. La reacción se dejó continuar durante 30 minutos a temperatura ambiente con inversión continua lenta. A continuación, la mezcla de producto se separó mediante desalación en PBS para eliminar el exceso de reactivo reductor. La concentración de la IgG después del procedimiento de desalación fue de 4,26 mg/ml para los conjugados A y B. Tras la conjugación y la reducción, el producto se separó aplicando el conjugado a una columna SE HPLC y recogiendo los conjugados con un peso molecular comprendido entre 450 y 1500 KDa. Se evaluaron las relaciones HRP:IgG como se ha descrito anteriormente.

E. Conjugado C: Oxidación de HRP

HRP se disolvió en agua a 5 mg/ml. Se añadieron 100 µl de peryodato de sodio recientemente preparado a una concentración de 8,74 mg/ ml (0,088 M) a cada mililitro de HRP con agitación a 4 °C. La mezcla se dejó reaccionar durante 20 minutos. Se añadieron 17 µl de etilenglicol por cada 5 mg de HRP para inactivar la reacción de oxidación, y la mezcla se dejó incubar durante 20 minutos más a 4 °C.

Se desaló 1,0 ml de enzima oxidada en una columna PD10 en un tampón de reacción adecuado, tal como tampón acetato 1 mM a pH 4,5, para separar la enzima del exceso de reactivos de oxidación e inactivación.

D. Conjugación con IgG

La HRP oxidada se conjugó con IgG mediante aminación reductora. La IgG se mezcló con la HRP oxidada en una relación 1:1 en volumen, y una relación molar de IgG:HRP de 1:4-15 y se dejó reaccionar durante dos horas hasta durante la noche a temperatura ambiente. Justo antes de la reacción de combinación, 100 µl de tampón carbonato 100 mM a pH 9,6 se añadieron a 1 ml de HRP oxidada. Se mezcló 1 ml de IgG con HRP oxidada en una relación 1:1 en volumen, a una relación molar aproximada de IgG:HRP de 1:4 HRP y se dejó reaccionar durante un mínimo de dos horas. El producto intermedio conjugado formado se redujo mediante la adición de 20 µl de borohidruro de potasio 4 mg/ml recientemente preparado. La reducción se dejó continuar durante 30 minutos a temperatura ambiente con inversión continua lenta. La mezcla se separó mediante desalación en PBS para eliminar el exceso de reactivo reductor.

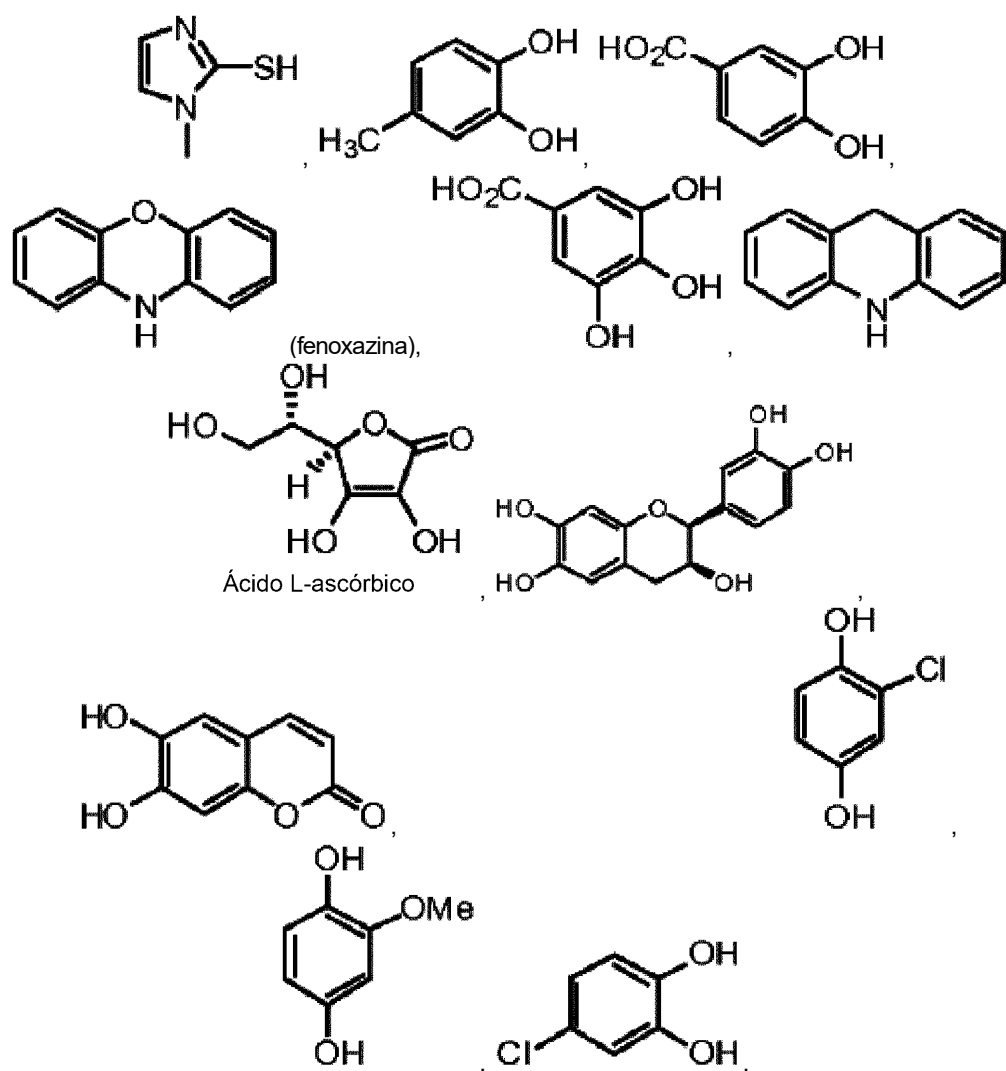
Tras la conjugación y la reducción, el producto se separó aplicando el conjugado a una columna SE HPLC y recogiendo los conjugados con un peso molecular comprendido entre 450 y 1500 KDa. Se evaluaron las relaciones HRP:IgG como se ha descrito anteriormente.

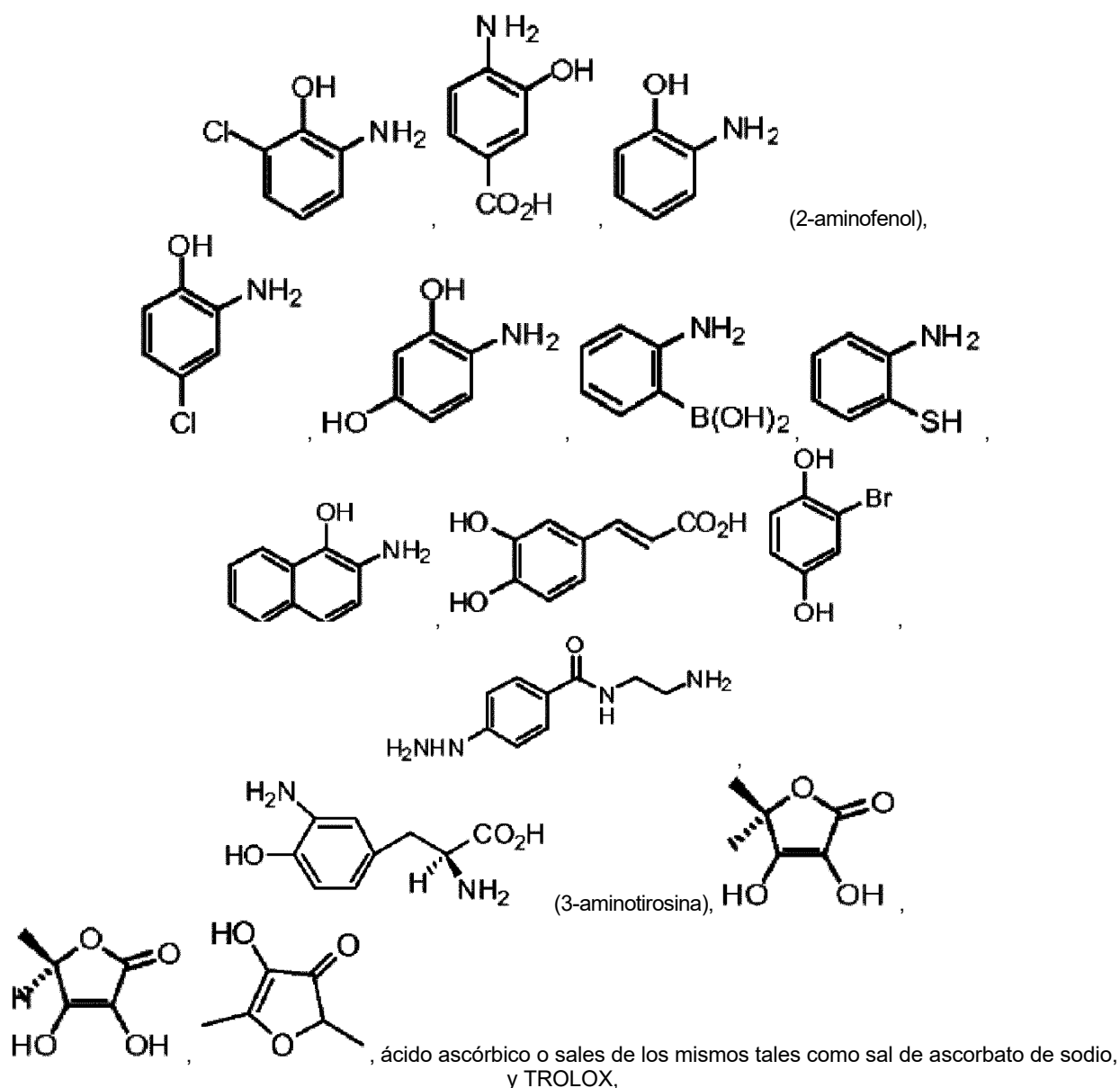
Tabla 31.

	[cTnI] ng/ml	STD HRP	A	B	C
s0	0	16.299	123.078	304.943	142.975
s1	0,039	28.111	277.115	610.073	225.401
s2	0,28	161.298	1.957.430	4.205.692	1.324.504
S3	1,04	531.785	22.820.047	47.324.173	15.879.973
s4	4,47	5.957.656	330.835.465	406.122.102	141.011.319
n.º relación					
1	s1/s0	1,7	2,3	2,0	1,6
2	s2/s0	9,9	15,9	13,8	9,3
3	s3/s0	32,6	185,4	155,2	111,1
4	s4/s0	365,5	2688,0	1331,8	986,3

REIVINDICACIONES

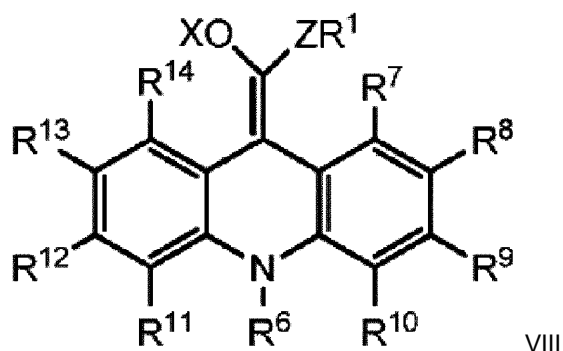
1. Un método de ensayo para un analito en una muestra, comprendiendo el método de ensayo: formar una mezcla de reacción en una solución acuosa, en cualquier orden o de forma simultánea añadiendo
5 muestra,
un compañero de unión específica marcado con quimioluminiscente,
10 un compañero de unión específica marcado con activador, en donde la marca de activador efectúa la activación de la marca quimioluminiscente, y
un inhibidor selectivo de señal,
15 en donde todos los componentes son solubles en solución acuosa,
en donde el compañero de unión específica marcado con quimioluminiscente y el compañero de unión específica marcado con activador se unen a analito presente en la muestra para formar un complejo de unión;
20 añadiendo a la mezcla de reacción una solución activadora, en donde la solución activadora libera una señal quimioluminiscente detectable correlacionada con la cantidad de compañero de unión específica marcado con quimioluminiscente unido a analito y de compañero de unión específica marcado con activador unido a analito en la mezcla de reacción,
25 en donde el inhibidor selectivo de señal se selecciona del grupo que consiste en





en donde:

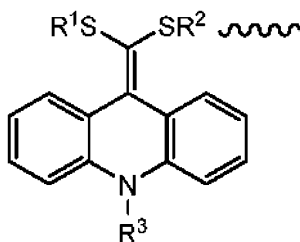
el compañero de unión específica marcado con quimioluminiscente comprende un compuesto con marca quimioluminiscente conectado directa o indirectamente a un miembro de par de unión específica, en donde la marca quimioluminiscente se selecciona de compuestos de acridano cetenoditioacetal, ésteres de acridano, tioésteres de acridano, acridano sulfonamidas, y derivados de acridano enol de fórmula VIII:



en donde R^1 se selecciona de grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo de 1-20 átomos de carbono, cualquiera de los cuales puede ser sustituido con grupos 1-3 seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(C_1-C_8 alquil)silil, un grupo SO_3^- , un grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosil, un grupo PO_3^- , un grupo OPO_3^{2-} , átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, grupos amino, grupos de amonio cuaternario o grupos de fosfonio cuaternario, en donde X se selecciona de grupos alquilo, arilo, aralquilo C_1-C_8 , teniendo los grupos alquilo o arilo carboxilo de 1-20 átomos de carbono, grupos tri(C_1-C_8 alquil)silil, un grupo SO_3^- , grupos glicosil y grupos fosforil de la fórmula $PO(OR')(OR'')$ en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de los grupos alquilo, cianoalquilo, arilo y aralquilo C_1-C_8 , grupos trialkilsilil, cationes de metales alcalinos, cationes alcalino-térreos, cationes de amonio y trialkilfosfonio, en donde Z se selecciona de átomos de O y S, en donde R^6 se selecciona de grupos alquilo, fenilo, benzilo, alcoxilquilo y carboxialquilo C_1-C_4 sustituidos o no sustituidos, en donde R^{7-14} son cada hidrógeno o se seleccionan 1 o 2 sustituyentes de alquilo, alcoxi, hidroxil y halógeno y el resto de R^{7-14} son hidrógeno o en donde cada uno de R^{7-14} es hidrógeno y R^1 es un sustituyente de marcado o en donde uno de R^{7-14} es un sustituyente de marcado y los otros de R^{7-14} son hidrógeno.

en donde el compañero de unión específica marcado con activador comprende un compuesto con marca de activador conectado directa o indirectamente a un miembro de un par de unión específica en donde la marca de activador se selecciona de sales metálicas de transición, complejos metálicos de transición y enzimas, en donde la marca de activador tiene actividad peroxidasa, y en donde la solución activadora comprende un compuesto de peróxido.

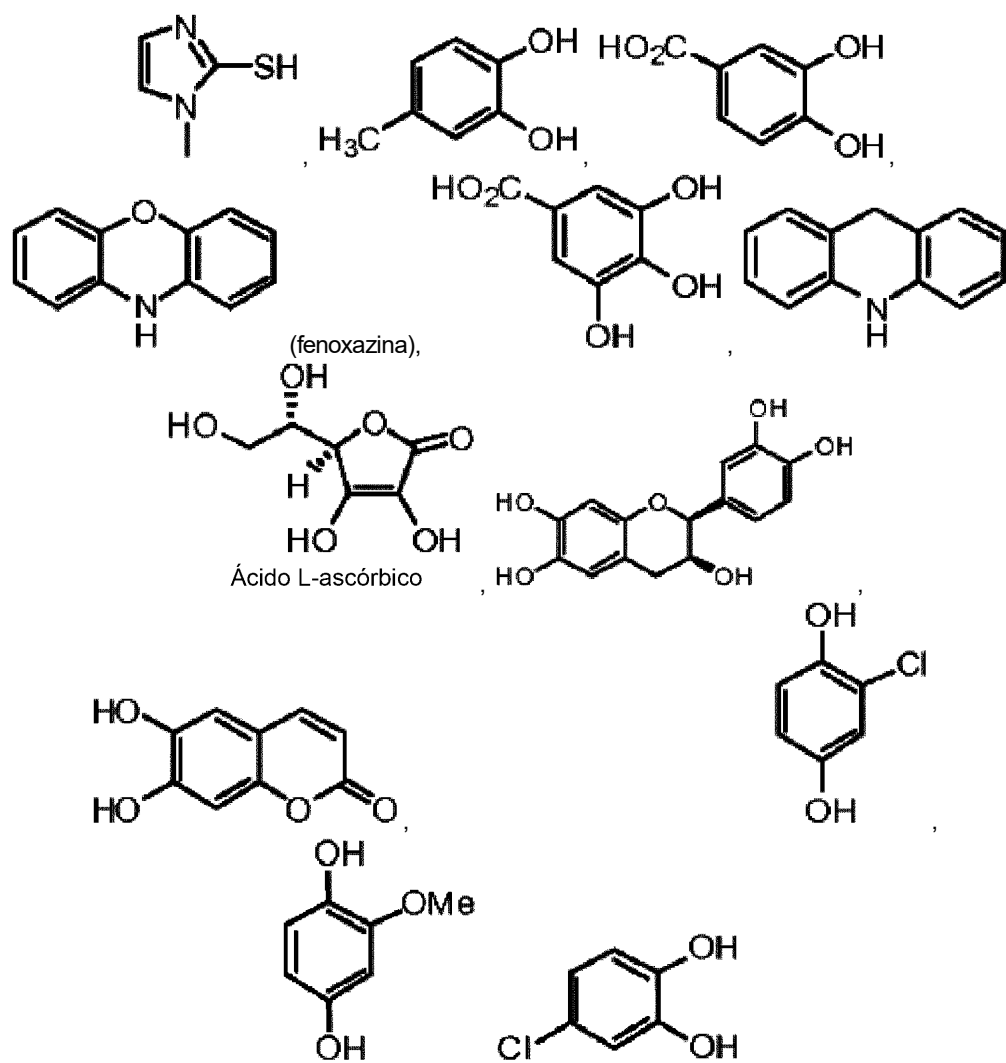
2. (Nuevo) El método de ensayo de la reivindicación 1, en donde la marca quimioluminiscente es un compuesto de acridano cetenoacetil de la fórmula

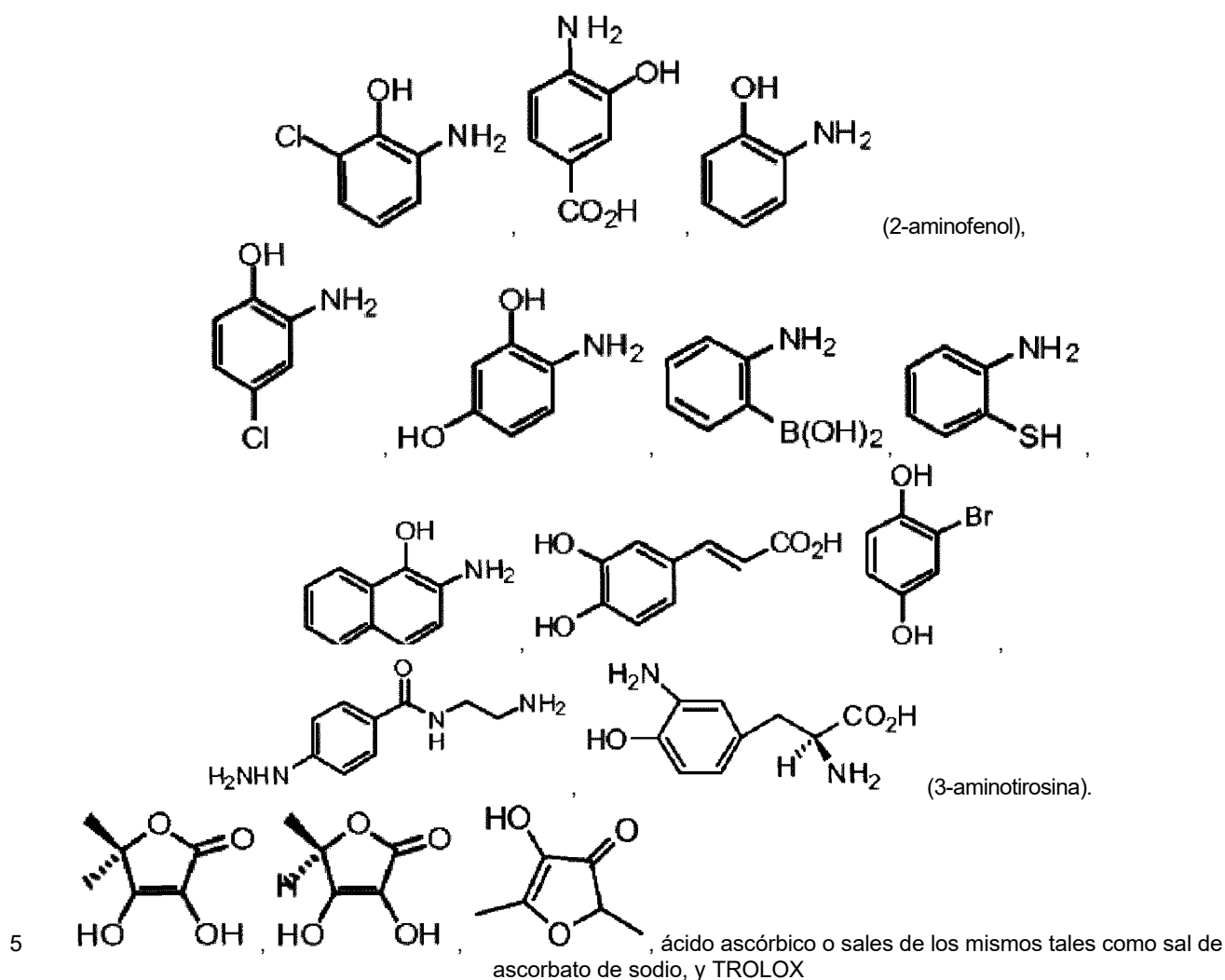


en donde $\sim$ designa el punto de unión de la marca quimioluminiscente al miembro de unión específica, en donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de grupos alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, y grupos aralquilo sustituido o no sustituido de 1-20 átomos de carbono, en donde cuando R^1 y R^2 es un grupo sustituido, puede ser sustituido con 1-3 grupos seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(alquil C_1-C_8)silil, un grupo SO_3^- , un grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosil, un grupo PO_3^- , un grupo OPO_3^{2-} , átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, grupos amino, un grupo $C(=O)NHNH_2$, grupos amonio cuaternario, y grupos fosfonio cuaternario, en donde R^3 se selecciona del grupo que consiste en grupos alquilo, alquilo sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, aralquilo sustituido o no sustituido de 1-20 átomos de carbono, grupos fenilo, benzilo sustituido o no sustituido, alcoxilquilo, carboxialquilo y grupos de ácido alquilsulfónico, en donde cuando R^3 es un grupo sustituido, puede estar sustituido con 1-3 grupos seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(alquil C_1-C_8)silil, un grupo SO_3^- , un grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosil, un grupo PO_3^- , un grupo OPO_3^{2-} , átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, grupos amino, grupos amonio cuaternario, y grupos fosfonio cuaternario.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el inhibidor selectivo de señal se selecciona de un grupo que consiste en ácido ascórbico, Trolox, fenoxazina, 3-aminotirosina, y 2-aminofenol.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto de marca de activador es una enzima peroxidasa.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde al menos uno del compañero de unión específica marcado con quimioluminiscente y el compañero de unión específica marcado con activador comprende una sustancia auxiliar seleccionada de proteínas solubles, estreptavidina, avidina, neutravidina, biotina, BSA cationizado, fos, jun, dendrímeros sintéticos solubles, polímeros sintéticos solubles, polímeros naturales solubles, polisacáridos, dextrano, oligonucleótidos, liposomas, micelas, y vesículas.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde formar una mezcla de reacción, en cualquier orden o de forma simultánea incluye además añadir un potenciador, en donde el potenciador es un compuesto o mezcla de compuestos que promueve la recuperación catalítica de un activador que tiene actividad peroxidasa, opcionalmente en donde el potenciador se selecciona de compuestos fenólicos, aminas aromáticas, benzoxazoles, hidroxibenzotiazoles, ácidos aril borónicos y mezclas de los mismos.

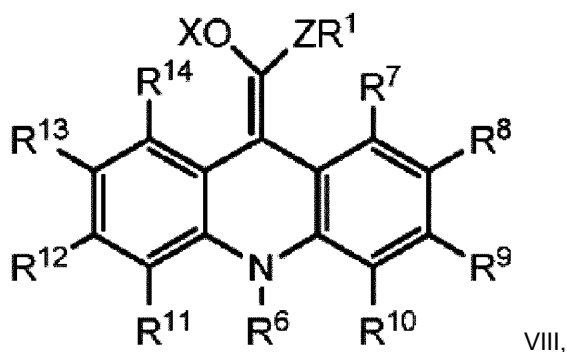
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la solución activadora comprende un potenciador seleccionado de compuestos fenólicos, aminas aromáticas, benzoxazoles, hidroxibenzotiazoles, ácidos aril borónicos y mezclas de los mismos.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compañero de unión específica marcado con quimioluminiscente comprende una marca quimioluminiscente conectada a un análogo del analito y en donde el analito y el análogo marcado con quimioluminiscente compiten por unirse al compañero de unión específica marcado con activador.
9. Un kit para detectar un analito en una muestra que comprende:
 - un primer compañero de unión específica del analito;
 - un compuesto quimioluminiscente conjugado con el primer compañero de unión específica;
 - un segundo compañero de unión específica del analito; y
 - un compuesto activador conjugado con el segundo compañero de unión específica,en donde el compuesto activador efectúa la activación del compuesto quimioluminiscente;
- un inhibidor selectivo de señal; y
- una solución activadora, en donde la solución activadora proporciona un reactivo necesario para generar el compuesto en estado excitado necesario para la quimioluminiscencia,
- en donde todos los componentes son solubles en solución acuosa,
- en donde el inhibidor selectivo de señal se selecciona del grupo que consiste en





en donde:

el compuesto quimioluminiscente se selecciona de compuestos de acridano cetenoditioacetil, ésteres de acridano, tioésteres de acridano, acridano sulfonamidas, y derivados de acridano enol de fórmula VIII:



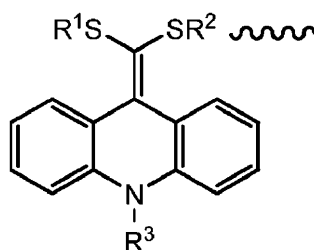
en donde R¹ se selecciona de grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y aralquilo de 1-20 átomos de carbono, cualquiera de los cuales puede ser sustituido con grupos 1-3 seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(C₁-C₈ alquil)silil, un grupo SO₃⁻, un grupo OSO₃⁻², grupos glicosil, un grupo PO₃⁻, un grupo OPO₃⁻², átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, grupos amino, grupos de amonio cuaternario o grupos de fosfonio cuaternario, en donde X se selecciona de grupos alquilo, arilo, aralquilo C₁-C₈, teniendo grupos alquilo o arilo carboxilo de 1-20 átomos de carbono, grupos tri(C₁-C₈ alquil)silil, un grupo SO₃⁻, grupos glicosil y grupos fosforil de la fórmula PO(OR')(OR'') en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de los grupos alquilo, cianoalquilo, arilo y aralquilo C₁-C₈, grupos trialquilsilil, cationes de metales alcalinos, cationes alcalino-térreos, cationes de amonio y trialquilfosfonio, en donde Z se

selecciona de átomos de O y S, en donde R^6 se selecciona de grupos alquilo, fenilo, benzilo, alcoxialquilo y carboxialquilo C_1 - C_4 sustituidos o no sustituidos, en donde R^{7-14} son cada hidrógeno o se seleccionan 1 o 2 sustituyentes de alquilo, alcoxi, hidroxi y halógeno y el resto de R^{7-14} son hidrógeno o en donde cada uno de R^{7-14} es hidrógeno y R^1 es un sustituyente de marcado o en donde uno de R^{7-14} es un sustituyente de marcado y los otros de R^{7-14} son hidrógeno.

en donde el compuesto activador se selecciona de sales metálicas de transición, complejos metálicos de transición y enzimas, en donde la marca de activador tiene actividad peroxidasa,

en donde la solución activadora comprende un peróxido seleccionado de peróxido de hidrógeno, peróxido de urea, y sales de perborato.

10. El kit de la reivindicación 9, en donde el compuesto quimioluminiscente es un compuesto de acridano cetenoditioacetal de la fórmula



en donde designa el punto de unión de la marca quimioluminiscente al miembro de unión específica, en donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de grupos alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, y grupos aralquilo sustituido o no sustituido de 1-20 átomos de carbono, en donde cuando R^1 y R^2 es un grupo sustituido, puede ser sustituido con 1-3 grupos seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(alquil C_1 - C_8)sililo, un grupo SO_3^- , un grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosil, un grupo PO_3^- , un grupo OPO_3^{2-} , átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, grupos amino, un grupo $C(=O)NHNH_2$, grupos amonio cuaternario, y grupos fosfonio cuaternario, en donde R^3 se selecciona del grupo que consiste en grupos alquilo, alquilo sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, aralquilo sustituido o no sustituido de 1-20 átomos de carbono, grupos fenilo, benzilo sustituido o no sustituido, alcoxialquilo, carboxialquilo y grupos de ácido alquilsulfónico, en donde cuando R^3 es un grupo sustituido, puede estar sustituido con 1-3 grupos seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(alquil C_1 - C_8)sililo, un grupo SO_3^- , un grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosil, un grupo PO_3^- , un grupo OPO_3^{2-} , átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, grupos amino, grupos amonio cuaternario, y grupos fosfonio cuaternario.

11. El kit de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde la solución activadora comprende un potenciador seleccionado de compuestos fenólicos, aminas aromáticas, benzoxazoles, hidroxibenzotiazoles, ácidos aril borónicos y mezclas de los mismos.

12. Un sistema para llevar a cabo el método de ensayo de la reivindicación 1 que comprende los componentes del kit de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, un sistema de manejo de fluidos para el suministro de una muestra en la mezcla de reacción, un sistema de manejo de fluidos para el suministro del compañero de unión específica marcado con quimioluminiscente, compañero de unión específica marcado con activador y el inhibidor selectivo de señal en la mezcla de reacción, y un sistema de manejo de fluidos para el suministro de la solución activadora en la mezcla de reacción para liberar una señal quimioluminiscente; y un sistema de detección para detectar la señal quimioluminiscente en donde el sistema de manejo de fluidos para el suministro de la solución activadora actúa de forma coordinada con el sistema de detección para medir la señal quimioluminiscente liberada y la siguiente inyección de fluido activador.