

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 018**

51 Int. Cl.:

C09K 11/07 (2006.01)

C12Q 1/28 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2007 PCT/US2007/068551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2007 WO07134098**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2007 E 07762048 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2021778**

54 Título: **Métodos de ensayo de no separación**

30 Prioridad:

09.05.2006 US 798839 P
08.05.2007 US 800963

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

AKHAVAN-TAFTI, HASHEM

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 628 018 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

Métodos de ensayo de no separación

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de ensayo novedosos que implican reacciones de unión específica que están simplificados en comparación con métodos conocidos. Los métodos de ensayo se denominan ensayos de no separación porque no requieren la retirada o separación del exceso de marcador de detección antes de la etapa de detección. Los métodos son aplicables a diversos tipos de ensayos que incluyen inmunoensayos, ensayos de receptor-ligando y ensayos de hibridación de ácido nucleico.

Antecedentes de la invención

15 Se ha dedicado un gran esfuerzo en el campo del desarrollo de ensayos, en particular en el desarrollo de inmunoensayos, para simplificar el diseño de los ensayos, conservando al mismo tiempo sus beneficios esenciales en cuanto a sensibilidad, rango dinámico, robustez, amplia aplicabilidad e idoneidad para la automatización. Una estrategia ha consistido en elaborar los denominados formatos de ensayo homogéneos en los que no se utiliza la separación de un compañero de unión específica marcado de forma detectable añadido. Este tipo de metodología se basa en la elaboración de un principio de detección que se activa o se desactiva como resultado de la reacción de unión. Por el contrario, los formatos de ensayo heterogéneos dependen de la separación física de los compañeros de unión específica marcados de forma detectable unidos y libres antes de la cuantificación.

25 Se han publicado numerosas patentes estadounidenses en el campo de inmunoensayos enzimáticos homogéneos. Muchos aprovechan la reacción de unión de anticuerpo:antígeno para activar o inhibir un enzima marcadora: US-3.817.837; US-3.852.157; US-3.875.011; US-3.966.556; US-3.905.871; US-4.065.354; US-4.043.872; US-4.040.907; US-4.039.385; US-4.046.636; US-4.067.774; US-4.191.613; US-4.171.244; y US-4.785.080. Otros inmunoensayos homogéneos implican diversos métodos de inactivación de la fluorescencia mediante anticuerpos u otros inactivadores de la fluorescencia: US-3.998.943; US-3.996.345; US-4.174.384; US-4.161.515; US-4.208.479; y US-4.160.016. Otras patentes más estadounidenses en este campo de tipos de inmunoensayo variados incluyen: US-3.935.074; US-4.130.462; y US-4.193.983. US-4.160.645 desvela un método de ensayo que utiliza un catalizador de transferencia de electrones como marcador. El catalizador (marcador) se desactiva por unión al anticuerpo.

35 Campbell y col., (Biochem. J., 216, 185-194 (1983)), desvela un método de detección que utiliza transferencia de energía entre un donador de quimioluminiscencia acoplado a un antígeno (Ag-L) y un aceptor de fluorescencia acoplado a un anticuerpo (Ab-F) en un formato de ensayo competitivo. El antígeno complejado emite finalmente a la longitud de onda del fluoróforo, mientras que el antígeno libre emite a la longitud de onda característica del marcador de quimioluminiscencia. Posteriormente, se mide la intensidad de la luz a dos longitudes de onda y la relación de las dos señales está relacionada con la cantidad de analito en la muestra.

40 Se conocen diversos inmunoensayos homogéneos diferentes: Rubenstein, y col., US-3.817.837 (inmunoensayo enzimático homogéneo); Ullman, US-3.996.345 (inmunoensayo homogéneo de inactivación de fluorescencia); Maggio, US-4.233.402 (inmunoensayo enzimático homogéneo de canalización de enzimas); y Boguslaski, y col., Patente Canadiense 1.082.577 (inmunoensayo enzimático homogéneo de cofactor de hapteno).

45 US-6.406.913 de Ullman desvela 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, que 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 del fotosensibilizador o el compuesto quimioluminiscente está asociado con una partícula suspendible y se une un miembro de un par de unión específica al mismo.

50 US-5.516.636 de McCapra desvela métodos de ensayo que comprenden ensayos de unión específica que utilizan un sensibilizador como marcador. El sensibilizador, cuando se estimula por radiación, transferencia de electrones, electrólisis, electroluminiscencia o transferencia de energía, alcanza un estado excitado, que (a) tras la interacción con el oxígeno molecular produce oxígeno singlete o (b) tras la interacción con un colorante leuco se reduce por oxígeno para producir peróxido de hidrógeno. Cualquiera de las dos interacciones con el sensibilizador excitado, con la adición de otros reactivos, produce una señal detectable.

55 US-6.911.305 de Levison desvela un método para detectar analitos polinucleotídicos unidos a un sensibilizador o a una sonda marcada con sensibilizador sobre una primera película. La película se pone en contacto con una segunda película que tiene un componente precursor quimioluminiscente inmovilizado sobre la misma; el precursor es capaz de producir un compuesto quimioluminiscente activable. El sensibilizador se excita para producir oxígeno singlete por reacción con el precursor quimioluminiscente para formar el compuesto quimioluminiscente activable sobre dicha

segunda película. A continuación, el compuesto quimioluminiscente activable se activa para producir una señal luminosa detectable sobre dicha segunda película.

5 US-6.994.980 y US-6.723.851 desvelan métodos para detectar un analito usando compuestos que quedan depositados sobre o unidos a un analito o al área que rodea al analito después de la reacción con una enzima. La enzima puede suministrarse en los métodos de ensayo en forma de un conjugado con una sustancia que se une específicamente al analito. El compuesto se suministra en forma libre para la reacción con la enzima, en una realización en forma de una composición líquida. Después de la deposición inducida por la reacción enzimática, el compuesto depositado se detecta mediante una reacción quimioluminiscente no enzimática de un resto de éster de acridinio contenido en la molécula con peróxido de hidrógeno a pH alcalino. No se produce reacción enzimática entre la enzima unida y el compuesto quimioluminiscente unido.

15 El documento US-6406913 describe un método para determinar la presencia de un analito que comprende combinar un medio del que se sospecha que contiene el analito con un miembro de un par de unión específica asociado a un fotosensibilizador y a una partícula suspendible y un miembro de par de unión específica asociado a un compuesto quimioluminiscente y a una partícula suspendible, formando un complejo en donde el analito lleva el fotosensibilizador y el compuesto quimioluminiscente en estrecha proximidad, activando el fotosensibilizador para generar oxígeno singlete, activando el compuesto quimioluminiscente con el oxígeno singlete para producir una señal detectable y detectar la señal producida.

20 El documento WO00/15618 describe ésteres de 9-carboxi xantano, tioésteres y sulfonimidias quimioluminiscentes enzimáticamente activables y ésteres de hidroxí acridano o tioésteres que son sustratos para la peroxidasa de rábano picante. Los sustratos quimioluminiscentes se describen como utilidad de búsqueda en métodos para determinar si un analito está presente en una muestra.

25 A pesar de los considerables esfuerzos realizados para elaborar formatos de ensayo homogéneos o de no separación, todavía no gozan de una amplia adopción comercial. Los ensayos heterogéneos se consideran más sencillos de desarrollar y de producir en masa, aunque son más complejos desde el punto de vista operativo. En particular, el campo de los inmunodiagnósticos clínicos de alto volumen y el campo más limitado de diagnósticos clínicos con ácidos nucleicos están dominados por los formatos de ensayo heterogéneos. Dentro de este campo, los formatos de ensayo serán beneficiosos para el campo lo que podría simplificar los protocolos, reducir la complejidad y mejorar la compatibilidad con la automatización mediante la eliminación de etapas innecesarias.

35 **Sumario de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones y se refiere a kits y a métodos que implican reacciones de unión específica, especialmente inmunoensayos, ensayos de receptores y ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, que están simplificados en comparación con métodos conocidos. Los métodos incluyen el uso de un compuesto quimioluminiscente inmovilizado y de un compuesto activador conjugado con un compañero de unión específica para inducir una reacción quimioluminiscente. La co-localización mediada por analito del compuesto marcador quimioluminiscente y del conjugado activador hace que la reacción quimioluminiscente resultante tenga lugar solamente en el sitio de las moléculas de analito unidas. La presencia de un exceso de conjugado activador no unido no contribuye a ni interfiere con la reacción quimioluminiscente. Como resultado, la intensidad de la quimioluminiscencia emitida es proporcional a la cantidad de analito. En una realización, se simplifican los ensayos eliminando las etapas de separación y lavado antes de la etapa de detección y, por lo tanto, pueden considerarse ensayos de no separación.

45 **Breve descripción de los dibujos**

50 La Figura 1 es un diagrama esquemático de la etapa de detección de un inmunoensayo realizado de acuerdo con la invención usando un anticuerpo de captura marcado.

La Figura 2 es un diagrama esquemático de la etapa de detección de otro inmunoensayo realizado de acuerdo con la invención usando una proteína de bloqueo marcada y un anticuerpo de captura no marcado.

55 La Figura 3 es un diagrama esquemático de la etapa de detección de otro inmunoensayo realizado de acuerdo con la invención usando una superficie sólida marcada y un anticuerpo de captura no marcado.

60 La Figura 4 es un gráfico que muestra la detección del antígeno de IgG en un inmunoensayo de no separación usando un anticuerpo de captura marcado inmovilizado en los pocillos de una microplaca y un exceso de conjugado anti-IgG-HRP para la detección.

65 La Figura 5 es un gráfico que muestra la detección del antígeno de IgG en un inmunoensayo de no separación realizado de acuerdo con la invención usando una proteína de bloqueo marcada y un anticuerpo de captura no marcado inmovilizado en los pocillos de una microplaca y un exceso de conjugado anti-IgG-HRP para la detección.

La Figura 6 es un diagrama esquemático de la etapa de detección de un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos realizado de acuerdo con la invención usando un ácido nucleico de captura marcado.

5 La Figura 7 es un diagrama esquemático de la etapa de detección de un inmunoensayo competitivo llevado a cabo de acuerdo con la invención utilizando una fase sólida marcada, un anticuerpo de captura inmovilizado y un analito o análogo de analito marcado.

10 La Figura 8 es un diagrama esquemático de la etapa de detección de otro inmunoensayo realizado de acuerdo con la invención haciendo uso de la unión de biotina-avidina para crear una superficie sólida marcada y manteniendo el marcador y el anticuerpo de captura en proximidad.

15 La Figura 9 es un diagrama esquemático de la etapa de detección de otro inmunoensayo realizado de acuerdo con la invención haciendo uso también de la unión de biotina-avidina para crear una superficie sólida marcada y manteniendo el marcador y el anticuerpo de captura en proximidad.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

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

25 *Analito* - Sustancia en una muestra que se va a detectar 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.

35 *Anticuerpo* - incluye la inmunoglobulina completa así como fragmentos nativos y diseñados.

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

40 *Arilo* - Grupo que contiene un anillo aromático que contiene de 1 a 5 anillos carbocíclicos aromáticos, que pueden estar sustituidos con uno 1 o más sustituyentes distintos del H.

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

50 *Compuesto quimioluminiscente* - Compuesto que sufre una reacción que da como resultado su conversión en otro compuesto formado en un estado excitado eléctricamente. 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.

55 *Heteroalquilo* - Grupo alquilo en el cual al menos uno de los átomos de carbono del anillo o no terminales de la cadena está 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 está reemplazado por un heteroátomo seleccionado de N, O o S. Los grupos ilustrativos incluyen los grupos piridilo, pirrolilo, tienilo, furilo, quinolilo y acridinilo.

60 *Partículas magnéticas* - En la presente memoria, abarca material en partículas que tiene un componente magnéticamente sensible. Magnéticamente sensible incluye materiales ferromagnéticos, paramagnéticos y superparamagnéticos. Un ejemplo de material magnéticamente sensible es la magnetita. Las partículas pueden tener una porción de núcleo sólido que es magnéticamente sensible y está rodeada por una o más capas no magnéticas. Como alternativa, la porción magnéticamente sensible puede ser una capa alrededor o puede él
65 partículas dispuestas dentro de un núcleo que no es magnéticamente sensible.

Muestra - Mezcla que contiene o que se sospecha que contiene un analito que se va a medir en un ensayo. Los analitos incluyen por ejemplo, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, hormonas, anticuerpos, fármacos y esteroides. Las muestras típicas que pueden usarse en los métodos de la invención incluyen fluidos corporales tales como sangre, que puede ser sangre anticoagulada como se suele encontrar en los especímenes de sangre recogidos, 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 procariontes.

Soporte sólido - un material que tiene 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.

Miembro de par de unión específica, compañero de unión específica - Una molécula, incluidas moléculas biológicas, que tiene una afinidad de unión específica por otra sustancia, incluidos ADN, ARN, oligonucleótidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, quimeras de anticuerpo-ADN, antígenos, haptenos, proteínas, péptidos, lectinas, avidina, estreptavidina y biotina. Los compañeros de unión específica pueden conjugarse con una o más moléculas, ya sean de un activador o de un compuesto quimioluminiscente.

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.

Dispositivo de ensayo - 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, placas de micropocillos, chips y portaobjetos sobre los que se forman o se imprimen matrices, tiras reactivas y membranas.

La presente invención se refiere a métodos de ensayo rápidos y sencillos para detectar la presencia, localización o cantidad de sustancias por medio de reacciones de par de unión específica. Los métodos requieren el uso de un compuesto quimioluminiscente inmovilizado, un compuesto activador conjugado con un compañero de unión específica para inducir una reacción quimioluminiscente y una solución activadora. Los métodos implican una o más reacciones de par de unión específica para detectar el analito. Como resultado de la unión de un compañero de unión específica marcado al analito, se aproxima a una corta distancia un activador a un compuesto quimioluminiscente inmovilizado, de tal forma que es eficaz para activar una reacción que genera quimioluminiscencia tras la adición de una solución activadora. El compañero de unión específica marcado con el activador se suministra en exceso al sistema respecto de la cantidad necesaria para unir todo el analito. El exceso de conjugado de activador no unido no necesita ser eliminado antes de la adición de la solución activadora y la detección ya que no participa en la reacción.

Por lo tanto, los presentes métodos difieren de los métodos de ensayo convencionales en que el compuesto quimioluminiscente y el activador están ambos restringidos a un soporte sólido a una proximidad operativa para permitir que se realice una reacción quimioluminiscente tras la adición de una solución activadora. La presencia de un exceso de activador no inmovilizado, si no se elimina, no invalida la capacidad de realizar ensayos de unión específica sensibles. Este hallazgo no se esperaba ni era predecible.

Significativamente, se ha observado que los formatos de ensayo que invierten los medios de inmovilización del compuesto quimioluminiscente y del activador no permiten que los ensayos se realicen con éxito en un formato sin lavado. Cuando el activador está inmovilizado en el soporte sólido y el compuesto quimioluminiscente se proporciona como un conjugado con un compañero de unión específica para la unión directa o indirecta a un analito, seguido de la adición de solución activadora, no puede correlacionarse la cantidad de luz producida con la cantidad de analito. Sin quedar ligados a cualquier teoría concreta, se cree que al menos un factor que contribuye al fallo de estos formatos inversos es que el exceso de conjugado de compañero de unión específica de compuesto quimioluminiscente no unido al analito está libre para moverse alrededor de la solución o mezcla de ensayo y encontrarse en proximidad operativa al activador inmovilizado.

En una realización, se proporcionan métodos de ensayo, en particular métodos de ensayo de unión, en los que se pone en proximidad operativa un compuesto quimioluminiscente inmovilizado y un conjugado activador a través de al menos una reacción de unión específica debida a la presencia de un analito, en donde el conjugado activador unido activa una reacción que genera quimioluminiscencia tras la adición de una solución activadora para detectar la presencia, la localización o la cantidad del analito.

En una realización, los presentes métodos también difieren de los métodos de ensayo convencionales en que no se elimina el conjugado activador no unido presente en gran exceso respecto de la cantidad asociada específicamente con el analito. Las muestras que contienen analito, conjugado activador y solución activadora pueden añadirse secuencialmente a un recipiente de ensayo, sin lavado o separaciones y se lee la luminiscencia. Como alternativa, la

muestra y el conjugado activador pueden premezclarse y añadirse al recipiente de ensayo que contiene un compañero de unión específica para capturar el analito y que contiene el marcador quimioluminiscente inmovilizado antes de introducir la solución activadora. No se requiere lavar ni separar el conjugado activador no unido sobrante. Otro punto de diferencia con los ensayos quimioluminiscentes convencionales conocidos en la técnica reside en el hecho de que ni el compuesto quimioluminiscente ni el activador (p.ej., peroxidasa) que participa en la producción de luz es libre de difundirse en solución. Ambos están limitados espacialmente. Parcialmente como consecuencia de esto, la generación de señales tiende a ser de corta duración.

Los ensayos convencionales que usan sustratos quimioluminiscentes y conjugados marcados con enzimas proporcionan un gran exceso de sustrato 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. Se considera necesario proporcionar dicho 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 difieren fundamentalmente de los métodos 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 matriz de automatizar y miniaturizar la ejecución del ensayo con todas las ventajas inherentes de la automatización y la miniaturización.

Los ensayos realizados de acuerdo con los presentes métodos implican cuatro etapas. En una primera etapa se proporciona un soporte sólido en un dispositivo de ensayo para capturar específicamente un analito de interés. El soporte sólido se proporciona con un compañero de unión específica inmovilizado para la unión directa o indirecta de un analito que se vaya a detectar. El soporte sólido está dotado además de un compuesto marcador quimioluminiscente inmovilizado sobre el mismo. La marca quimioluminiscente puede proporcionarse de varias maneras diferentes, tal como se describe en detalle más adelante. En cada variante, el marcador quimioluminiscente está fijado de manera estable o irreversible a una sustancia o material de una manera que hace que quede inmóvil. El término “irreversiblemente” indica que el marcador quimioluminiscente no se elimina sustancialmente del soporte sólido en las condiciones de uso del ensayo en cuestión. También se contemplan medios de anclaje pasivo o no covalente siempre que el marcador se una y retenga de manera estable sobre el soporte sólido en las condiciones de uso. En una segunda etapa, la muestra que contiene el analito y el conjugado activador se introducen en el dispositivo de ensayo que tiene el compañero de unión específica inmovilizado sobre el soporte sólido para el analito y se deja que formen complejos de unión específica. La muestra y el conjugado activador se pueden añadir por separado en cualquier orden o simultáneamente o se pueden premezclar y añadir como una combinación. En este punto, puede aplicarse un tiempo de retardo opcional para permitir que se produzcan las reacciones de unión. También se puede incluir una etapa de lavado opcional si se desea eliminar los materiales extraños de la muestra. En la tercera etapa se añade una solución activadora para producir la quimioluminiscencia para detectar el analito. Finalmente, se detecta la quimioluminiscencia. Normalmente se mide el pico de nivel de intensidad de luz o la intensidad total de luz integrada. Puede relacionarse la cantidad de luz con la cantidad de analito construyendo una curva de calibración según métodos generalmente conocidos. Cuando la emisión de luz se produce con rapidez tras la adición de la solución activadora, es deseable temporizar mecánicamente el inicio de la medición con la adición mediante un inyector adecuado o efectuar la adición con el dispositivo de ensayo ya expuesto al detector. En este sentido, la etapas tercera y cuarta son esencialmente simultáneas. 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.

Formatos de ensayo y soportes sólidos

En los métodos de la presente invención, el marcador quimioluminiscente se inmoviliza a una superficie de un soporte sólido. Se proporciona un medio para atraer el analito a la superficie, p. ej., mediante un compañero de unión específica no marcado para el analito. El marcador quimioluminiscente se asocia con el activador por virtud de una reacción de unión específica que aproxima el activador al marcador quimioluminiscente inmovilizado unido al soporte sólido. A continuación, se añade la solución activadora y se mide la quimioluminiscencia.

En una realización, el marcador quimioluminiscente está unido de manera covalente a un compañero de unión específica inmovilizado para el analito. Un ejemplo sería un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de captura marcado inmovilizado sobre los pocillos de una microplaca o sobre una partícula. La inmovilización del compañero de unión específica puede ser por enlace covalente o por un proceso de adsorción. En este formato, representado en la Figura 1, el marcador quimioluminiscente se asocia con el activador por virtud de dos compañeros de unión específica uniéndose ambos a un analito en un formato “sándwich”. En otra realización, representada en la Figura 2,

el marcador quimioluminiscente está unido covalentemente a una sustancia auxiliar que se inmoviliza sobre el soporte sólido de una manera aleatoria. La inmovilización de la sustancia auxiliar puede ser por unión covalente o por un proceso de adsorción. De este modo, el marcador se distribuye más o menos uniformemente alrededor de la superficie del soporte sólido. Se proporciona un medio para atraer el analito a la superficie, p. ej., mediante un compañero de unión específica no marcado para el analito. El marcador quimioluminiscente se asocia con el activador por virtud de una reacción de unión específica que aproxima el activador al marcador quimioluminiscente unido a la sustancia auxiliar unida o recubierta pasivamente sobre la superficie del soporte. En otra realización, el marcador quimioluminiscente está unido covalentemente a un anticuerpo universal inmovilizado que tiene afinidad de unión para un anticuerpo de captura específico del analito. En otra realización, la sustancia auxiliar a la que está unido el marcador quimioluminiscente de manera covalente es una proteína o un péptido. Las proteínas ejemplares incluyen albúmina o estreptavidina. El compuesto quimioluminiscente puede proporcionarse para su inmovilización usando un conjugado de compuesto quimioluminiscente-biotina. Los formatos de ensayo de este tipo pueden proporcionar el compañero de unión específica para el analito en forma de un conjugado de biotina o mediante inmovilización directa al soporte sólido o mediante unión indirecta a través de un componente de captura universal tal como una anti-inmunoglobulina específica de especie. En otra realización, la sustancia auxiliar a la que está unido covalentemente el marcador quimioluminiscente es un polímero sintético. Los formatos de ensayo que usan adyuvantes poliméricos para inmovilizar el compuesto quimioluminiscente pueden proporcionar el compañero de unión específica del analito en forma de un conjugado de biotina o por inmovilización directa al soporte sólido o por unión indirecta a través de un componente de captura universal tal como una inmunoglobulina específica de especie.

En otra realización, el marcador quimioluminiscente está unido covalentemente a la superficie del soporte sólido. Como se representa en la Figura 3, el marcador se distribuye de este modo más o menos uniformemente alrededor de la superficie del soporte sólido. Se proporciona un medio para atraer el analito a la superficie, p. ej., mediante un compañero de unión específica no marcado para el analito. El marcador quimioluminiscente se asocia con el activador por virtud de una reacción de unión específica que aproxima el activador al marcador quimioluminiscente unido directamente a la superficie del soporte. A continuación, sin lavado o separación, se añade la solución activadora y se mide la quimioluminiscencia.

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. (Figura 7)

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 invención que usa ácidos nucleicos como compañeros de unión específica, se une covalentemente o se inmoviliza físicamente un ácido nucleico sobre una superficie de un soporte sólido para capturar un analito de ácido nucleico. El marcador quimioluminiscente se puede unir al ácido nucleico de captura, como se muestra esquemáticamente en la Figura 6 o puede asociarse el marcador con el soporte como se ha explicado anteriormente. 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, el marcador quimioluminiscente de archivo se asocia con el activador por virtud de reacciones de hibridación específicas que aproximan el activador al marcador 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.

Además de los sistemas basados en anticuerpos y los sistemas basados en ácidos nucleicos, los expertos en la técnica de los ensayos de unión conocen otros pares de unión específica que pueden servir como base para los métodos de ensayo según la presente invención. También se pueden utilizar pares anticuerpo-hapteno. Son ilustrativos los pares fluoresceína/antifluoresceína, digoxigenina/antidigoxigenina, y nitrofenilo/antinifeno. Como ejemplo adicional, se puede utilizar el par de unión a (estrept)avidina/biotina de sobra conocido. Para ilustrar una manera en la que se podría usar este par de unión, puede unirse covalentemente o adsorberse sobre un soporte sólido un conjugado de estreptavidina-marcador quimioluminiscente. A continuación, se añade un analito marcado con biotina y un conjugado activador, en donde el conjugado está unido a un anticuerpo anti-biotina o a un anticuerpo anti-analito. Después de dejar que se formen los complejos, se añade la solución activadora y se lleva a cabo la detección como en el caso anterior. En otra realización, la avidina o estreptavidina se deposita sobre un soporte sólido. Se une a la avidina un conjugado de biotina-compuesto quimioluminiscente y también se une un anticuerpo biotinilado. En otra realización, la biotina está unida al soporte sólido y se usa para capturar avidina o estreptavidina. También está unido un anticuerpo biotinilado. El compuesto quimioluminiscente puede fijarse al soporte sólido ya sea uniendo un conjugado de biotina-compuesto quimioluminiscente a la (estrept)avidina o marcando la superficie directamente con el compuesto quimioluminiscente. Los compañeros de unión específica adicionales conocidos en la técnica incluyen la porción Fab de anticuerpos, lectina-carbohidrato, proteína A-IgG y hormona-receptor de hormonas. Debe entenderse que se puede emplear la unión indirecta del compuesto quimioluminiscente al soporte sólido en la práctica de la presente invención.

Los soportes sólidos útiles en la práctica de la presente invención pueden ser de diversos materiales, porosidades, formas y tamaños. Los materiales ya en uso en ensayos de unión, incluidos placas de micropocillos de 96 pocillos, 384 pocillos o variedades de un número mayor, tubos de ensayo, recipientes para muestras, esferas de plástico, tiras reactivas de celulosa, papel o plástico, partículas de látex, partículas poliméricas que tienen diámetros de 0,10-50 μm , partículas de sílice que tienen diámetros de 0,10-50 μm , partículas magnéticas, especialmente aquellas que tienen diámetros medios de 0,1-10 μm , nanopartículas de diversos materiales y coloides metálicos, pueden proporcionar un soporte sólido útil para la fijación de marcadores quimioluminiscentes y para inmovilizar compañeros de unión específica. Las partículas magnéticas pueden comprender un núcleo de metal magnético, óxido de metal magnético o sulfuro metálico, que está generalmente rodeado por una capa unida de forma adsorptiva o covalente para proteger el componente magnético. El componente magnético puede ser hierro, óxido de hierro o sulfuro de hierro, en donde el hierro es Fe^{2+} o Fe^{3+} o ambos. Los materiales utilizables en esta clase incluyen, p. ej., magnetita, maghemita y pirita. Otros óxidos metálicos magnéticos incluyen MnFe_2O_4 , NiFe_2O_4 y CoFe_2O_4 . El componente magnético puede ser, p. ej., un núcleo sólido que está rodeado por una cubierta no magnética o puede ser un núcleo de material magnético y no magnético intercalado o puede ser una capa que rodea un núcleo no magnético, rodeado opcionalmente por otra cubierta no magnética. El material no magnético en dichas partículas magnéticas puede ser sílice, polímeros sintéticos tales como poliestireno, resina Merrifield, poliácridatos o copolímeros de estireno-acrilato o puede ser un polímero natural tal como agarosa o dextrano.

La presente divulgación muestra métodos para funcionalizar dichos materiales para su uso en los presentes métodos de ensayo. En particular, se describen métodos para unir tanto un compuesto marcador quimioluminiscente como un compañero de unión específica, tal como un anticuerpo, a la misma superficie, especialmente a los pocillos de una microplaca o a una micropartícula. Los soportes adecuados usados en ensayos incluyen soportes poliméricos sintéticos tales como poliestireno, polipropileno, poliestireno sustituido (p. ej., poliestireno aminado o carboxilado), poliácridamidas, poliamidas, cloruro de polivinilo, perlas de vidrio, partículas de sílice, partículas de sílice funcionalizada, coloides metálicos, agarosa, nylon, difluoruro de polivinilideno, nylon de superficie modificada y similares.

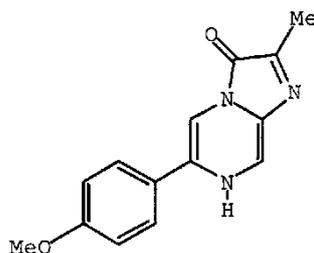
Compuestos marcadores quimioluminiscentes

Los compuestos usados como marcadores quimioluminiscentes en la práctica de la presente invención tienen la fórmula general CL-L-RG, en donde CL es un resto quimioluminiscente, L indica un resto de unión para unir el resto quimioluminiscente y un grupo reactivo y RG indica un resto de grupo reactivo para su acoplamiento a otro material. Las expresiones "grupo quimioluminiscente" y "resto quimioluminiscente" se usan de manera intercambiable, al igual que las expresiones "resto de unión" y "grupo de unión". El resto 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 emisor, 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 de la invención, los compuestos quimioluminiscentes pueden oxidarse para producir quimioluminiscencia en presencia del activador y de una solución activadora. Una clase ejemplar de compuestos que por incorporación de un enlazador y un grupo reactivo podría servir como marcador quimioluminiscente incluye diacilhidrazidas cíclicas aromáticas tales como luminol e hidrazidas cíclicas estructuralmente relacionadas, incluidos

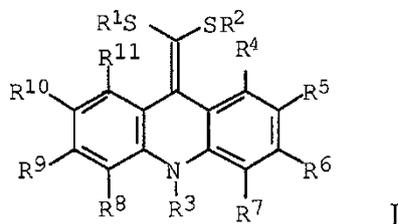
5 isoluminol, aminobutiletisoluminol (ABEI), aminohexiletisoluminol (AHEI), hidrazida del ácido 7-dimetilaminonaftaleno-1,2-dicarboxílico, aminotftalhidrazidas sustituidas en el anillo, hidrazidas del ácido antraceno-2,3-dicarboxílico, hidrazidas del ácido fenantreno-1,2-dicarboxílico, hidrazidas del ácido pirenodicarboxílico, 5-hidroxiftalhidrazida, 6-hidroxiftalhidrazida, así como otros análogos de ftalazinadiona descritos en US-5.420.275 de Masuya y col. y en US-5.324.835 de Yamaguchi.

10 Se considera que cualquier compuesto que se sepa que produce quimioluminiscencia mediante la acción de peróxido de hidrógeno y una peroxidasa funcionará como resto quimioluminiscente del compuesto marcador quimioluminiscente usado en la presente invención. Se conocen en la técnica numerosos compuestos de diversas clases estructurales, incluidos colorantes de xanteno tales como fluoresceína, eosina, colorantes de rodamina o colorantes de rodio, aminas aromáticas y aminas heterocíclicas, para producir quimioluminiscencia bajo estas condiciones. Otro ejemplo es el compuesto MCLA, 2-metil-6-(p-metoxifenil)-3,7-dihidroimidazo [1,2-a] pirazin-3-ona que tiene la fórmula:



20 Otro ejemplo es ácido indol acético, otro es isobutiraldehído, estando este último típicamente acompañado por un aceptor de energía de fluorescencia para aumentar la salida de luz visible. Los compuestos trihidroxiaromáticos pirogalol, floroglucinol y purpuroglina, individualmente o en combinación, son otros ejemplos de compuestos que pueden servir como restos quimioluminiscentes en los compuestos marcadores quimioluminiscentes de la invención.

En una realización, un grupo de compuestos con marcador quimioluminiscente que comprende un acridano cetenditioacetal útil en los métodos de la invención comprende compuestos de acridano con la fórmula I



en donde al menos uno de los grupos $R^1 - R^{11}$ es un sustituyente marcador de la fórmula



35 en donde L es un grupo de unión que puede ser un enlace 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 $R^4 - R^{11}$.

40 Los grupos R^1 y R^2 en el compuesto de la fórmula I pueden ser cualquier grupo orgánico que contenga de 1 a aproximadamente 50 átomos distintos de 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 de la presente invención, se produce un compuesto en estado excitado y puede implicar 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 o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido, alquino sustituido o 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 sustituirse con 1-3 grupos seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(alquilo $C_1 - C_3$)silo, un grupo SO_3^- , un grupo OSO_3^- , grupos glicosilo, un grupo PO_3^- , un grupo OPO_3^- , átomos de halógeno, 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 unión y RG es un grupo reactivo.

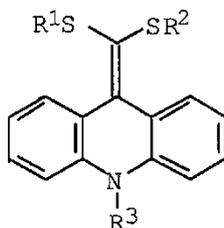
50

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, alqueno sustituido o no sustituido, alquino 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 alcoxilquilo, carboxialquilo y de ácido alquilsulfónico. 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 I, 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 contienen 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, alqueno, alquino, alcoxi, ariloxi, halógeno, amino, amino sustituido, carboxilo, carboalcoxi, carboxamida, ciano y sulfonato. Es posible unir pares de grupos adyacentes, p. ej., R^4 - R^5 o R^5 - R^6 , para formar un sistema de anillos carbocíclico o heterocíclico que comprenda al menos un anillo de 5 o 6 miembros condensado 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^5 , R^6 , R^9 o R^{10} como un halógeno y el otro de R^4 - R^{11} son átomos de hidrógeno.

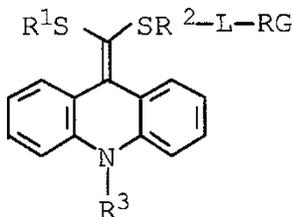
Los grupos sustituyentes pueden incorporarse en diversas cantidades y en posiciones seleccionadas en el anillo o la cadena en el anillo de acridano con el fin de modificar las propiedades del compuesto o para conveniencia de la síntesis. Estas propiedades incluyen, p. ej., el rendimiento cuántico de 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. En los ejemplos específicos a continuación se ilustran sustituyentes específicos y sus efectos, los cuales, sin embargo, no deben considerarse en modo alguno como limitantes del alcance de la invención. 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.

En otra realización, un grupo de compuestos tiene fórmula II 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.



II

Los compuestos marcadores de las fórmulas I o II 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 III.

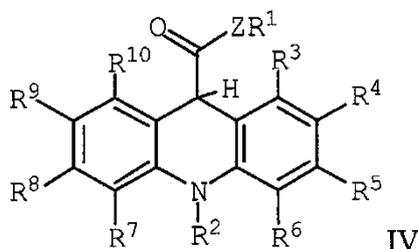


III

En los ejemplos específicos a continuación se describen compuestos marcadores representativos y su uso unidos a otras moléculas y superficies sólidas.

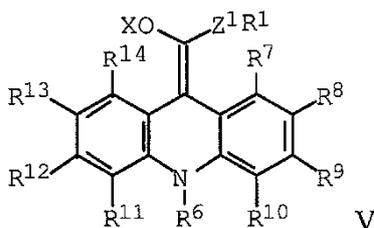
Otra clase de restos quimioluminiscentes incluye los ésteres, tioésteres y sulfonamidas de acridano descritas en US-5.491.072; US-5.523.212; US-5.593.845; y US-6.030.803. Los compuestos marcadores quimioluminiscentes en esta clase tienen un resto quimioluminiscente CL de la fórmula IV que se indica más adelante en donde Z es O, S o $NR^{11}SO_2Ar$, en donde R^{11} es alquilo o arilo, en donde Ar es arilo o arilo sustituido por alquilo, en donde R^1 es alquilo C_{1-8} , alquilo C_{1-8} sustituido por halo, alquilo, aralquilo o arilo sustituido por grupos alquilo, alqueno, alquino,

aralquilo, arilo, alcoxi, alcoxialquilo, halógeno, carbonilo, carboxilo, carboxamida, ciano, trifluorometilo, trialquiloamonio, nitro, hidroxilo, amino y mercapto, en donde R^2 se selecciona de los grupos alquilo, heteroalquilo, arilo y aralquilo y en donde R^{3-10} son cada uno hidrógeno o 1 o 2 sustituyentes se seleccionan de alquilo, alcoxi, hidroxilo y halógeno y los R^{3-10} restantes son hidrógeno. En una realización cada uno de los R^{3-10} es hidrógeno y R^1 es un sustituyente marcador. En otra realización, uno de R^{3-10} es un sustituyente marcador y los otros de R^{3-10} son hidrógeno.

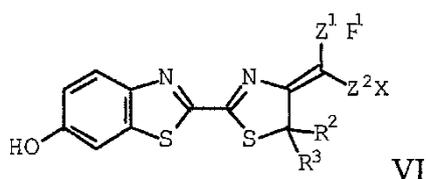


Otra clase de restos quimioluminiscentes incluye los compuestos heterocíclicos descritos en US-5.922.558; US-6.696.569; y US-6.891.057. En una realización, los compuestos comprenden un anillo heterocíclico, que comprende un anillo de cinco o seis miembros que contiene nitrógeno, oxígeno o azufre o un 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 tienen un resto de acridano quimioluminiscente CL de la fórmula V que se indica más adelante en donde R^1 se selecciona de grupos alquilo, alqueno, alquino, arilo y aralquilo de 1-20 átomos de carbono, cualquiera de los cuales puede ser sustituido con 1-3 grupos seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(alquilo C_1-C_8)sililo, un grupo SO_3^- , un grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosilo, un grupo PO_3^- , un grupo OPO_3^{2-} , átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, 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 , con los grupos alquilo o arilo carboxilo con 1-20 átomos de carbono, grupos tri(alquilo C_1-C_8)sililo, un grupo SO_3^- , grupos glicosilo y grupos fosforilo 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 trialquilsililo, cationes de metales alcalinos, cationes alcalino-térreos, cationes de amonio y trialquilsililfosfonio, en donde Z^1 se selecciona de átomos de O y S, en donde R^6 se selecciona de grupos alquilo, fenilo, bencilo, alcoxialquilo y carboxialquilo C_1-C_4 sustituidos y no sustituidos, en donde R^{7-14} son cada hidrógeno o se seleccionan 1 o 2 sustituyentes de alquilo, alcoxi, hidroxilo 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.



En otra realización, los compuestos marcadores quimioluminiscentes tienen un resto quimioluminiscente CL de la fórmula VI que se indica más adelante en donde R^1 se selecciona de grupos alquilo, alqueno, alquino, arilo y aralquilo de 1-20 átomos de carbono, cualquiera de los cuales puede ser sustituido con 1-3 grupos seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri(alquilo C_1-C_8)sililo, un grupo SO_3^- , un grupo OSO_3^{2-} , grupos glicosilo, un grupo PO_3^- , un grupo OPO_3^{2-} , átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, 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 , con los grupos alquilo o arilo carboxilo con 1-20 átomos de carbono, grupos tri(alquilo C_1-C_8)sililo, un grupo SO_3^- , grupos glicosilo y grupos fosforilo 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 trialquilsililo, cationes de metales alcalinos, cationes alcalino-térreos, cationes de amonio y trialquilsililfosfonio, en donde cada uno de Z^1 y Z^2 se selecciona de átomos de O y S y en donde R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_8 .

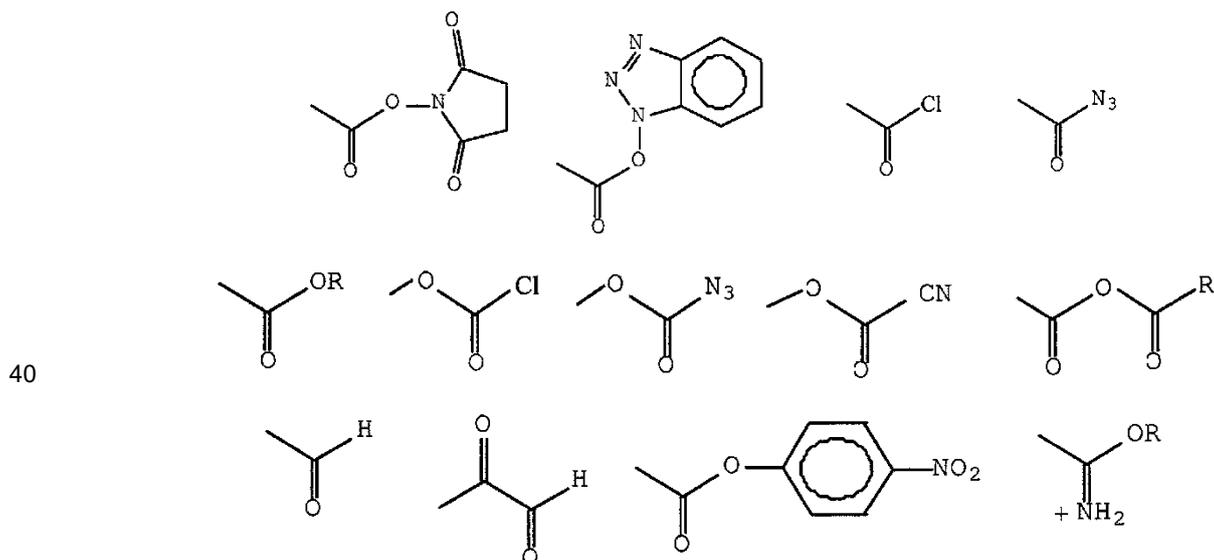


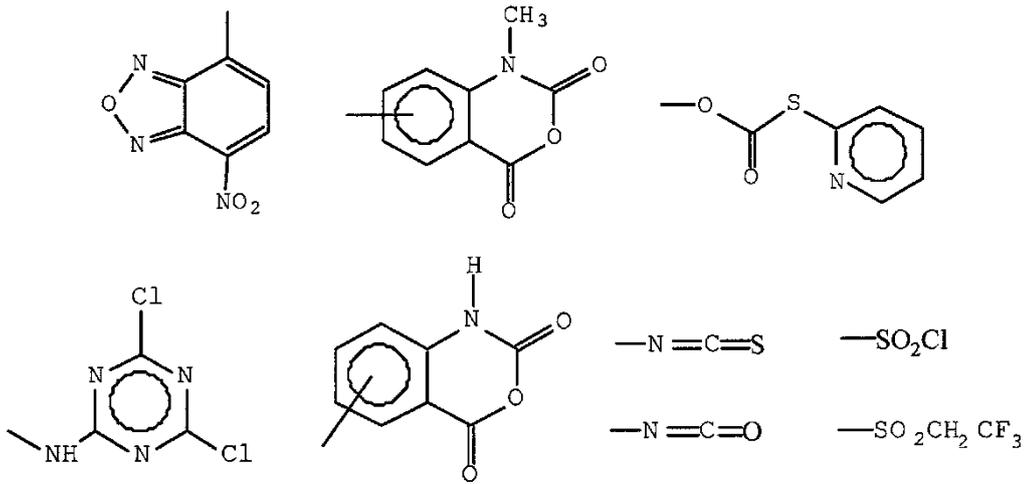
5 Grupo de unión (L). El grupo de unión en cualquier compuesto quimioluminiscente usado en la presente invención puede ser un enlace, un átomo, grupos divalentes y grupos polivalentes o una cadena lineal o ramificada de átomos, algunos de los cuales pueden ser parte de la estructura de un anillo. El 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 alquileo, arileno, alquenileno, 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 alquileo de 1-20 átomos que termina en un grupo -CH₂-, -O-, -S-, -NH-, -NR-, -SiO-, -C(=O)-, -OC(=O)-, -C(=O)O-, -SC(=O)-, -C(=O)S-, -NRC(=O)-, -NRC(=S)-, o -C(=O)NR-, en donde R es alquilo C₁₋₈. En otra realización, el grupo de unión es una cadena de poli(alquilen-oxi) de 3-30 átomos que termina en un grupo -CH₂-, -O-, -S-, -NH-, -NR-, -SiO-, -C(=O)-, -OC(=O)-, -C(=O)O-, -SC(=O)-, -C(=O)S-, -NRC(=O)-, -NRC(=S)- o -C(=O)NR-, en donde R es alquilo C₁₋₈.

20 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 invención a otro compuesto 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 nucleófilo. 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.

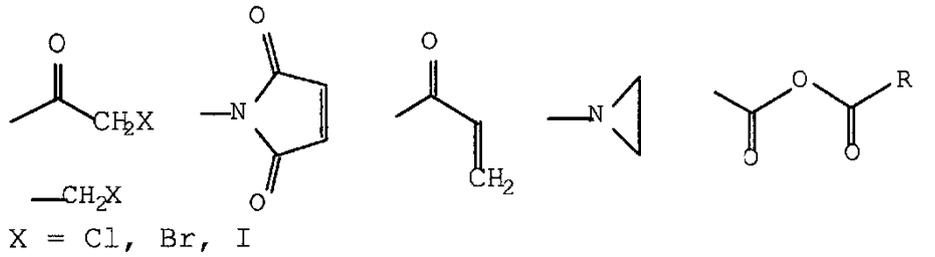
35 Tabla 1. Grupos reactivos para la unión química de marcadores a moléculas orgánicas y biológicas

a.) Grupos amina reactivos.

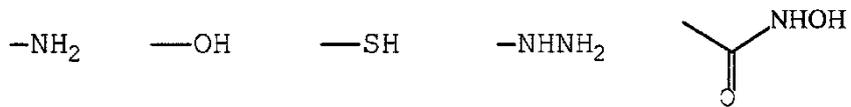




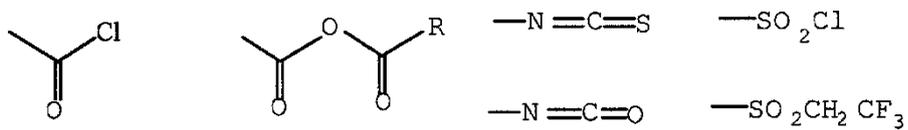
5 b.) Grupos tiol reactivos.



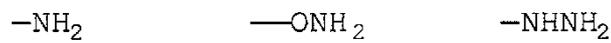
10 3) Grupos ácido carboxílico reactivos.



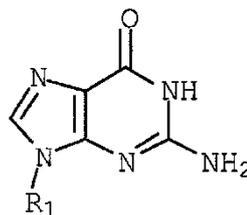
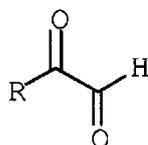
15 4) Grupos hidroxilo reactivos.



20 5) Grupos aldehído/cetona reactivos.



6) Otros grupos reactivos.



En una realización, los grupos reactivos incluyen OH, NH₂, ONH₂, NHH₂, COOH, SO₂CH₂CF₃, éster N-hidroxisuccinimida, éter N-hidroxisuccinimida y grupos maleimida.

5 También pueden usarse reactivos de acoplamiento bifuncionales para acoplar marcadores a moléculas orgánicas y biológicas con grupos moderadamente reactivos (véase L. J. Kricka, *Ligand-Binder Assays*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1985, págs. 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.

Conjugado activador

15 El compuesto activador forma parte de un conjugado de compañero de unión específica de activador. El conjugado tiene 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 conjugado 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 el activador incluyen compuestos con actividad tipo peroxidasa incluidos sales de metales de transición y complejos y enzimas, especialmente enzimas que contienen metales de transición, mucho más especialmente enzimas peroxidasa. Los metales de transición útiles en los compuestos activadores incluyen los grupos 3-12 de la tabla periódica, en especial hierro, cobre, cobalto, cinc, manganeso y cromo. Ha de apreciarse que las moléculas activadoras responsables de la generación de señales pueden operar dentro de un radio físicamente confinado y solo tienen contacto con un suministro finito de compuesto quimioluminiscente. Esto parece excluir una gran rotación catalítica en los casos en que el activador posea ese potencial.

30 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, peroxidasa fúngica, lignina peroxidasa, peroxidasa de *Arthromyces ramosus*, manganeso peroxidasa producida en hongos de podredumbre blanca, y peroxidasa de soja. 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, y col., *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.

40 También pueden usarse en el método conjugados o complejos de una peroxidasa y una molécula biológica para producir quimioluminiscencia, siendo la única condición que el conjugado presente actividad peroxidasa o actividad tipo 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 invención.

Composiciones de materia

55 En otra realización de la presente invención, se proporcionan materiales de ensayo que comprenden un soporte sólido que tiene inmovilizado en el mismo un compuesto quimioluminiscente. El compuesto quimioluminiscente es un sustrato para una enzima peroxidasa. La cantidad del compuesto quimioluminiscente inmovilizado sobre el soporte sólido puede variar en un intervalo de densidades de carga. Como ejemplo, cuando el soporte sólido es un material particulado, se puede usar una carga en el intervalo de 100 - 0,01 µg de compuesto quimioluminiscente por mg de partícula. En otro ejemplo, se puede usar una carga en el intervalo de 5-0,1 µg de compuesto quimioluminiscente por mg de partícula. El compuesto quimioluminiscente se distribuye generalmente aleatoriamente o uniformemente sobre el soporte sólido. Puede inmovilizarse sobre la superficie o dentro de los poros accesibles del soporte sólido. El compuesto quimioluminiscente puede inmovilizarse sobre el soporte sólido por unión covalente. En esta realización, se hace reaccionar un compuesto marcador quimioluminiscente que tiene un grupo reactivo con un

grupo funcional presente en el soporte sólido con el fin de formar un enlace covalente entre el compuesto quimioluminiscente y el soporte sólido. En una realización alternativa, el compuesto quimioluminiscente puede inmovilizarse sobre el soporte sólido por medio de una o más sustancias intermedias. En un ejemplo, la biotina está unida covalentemente al soporte sólido, la biotina unida covalentemente está unida a la estreptavidina y entonces se une un conjugado de biotina-compuesto quimioluminiscente. En otro ejemplo, la estreptavidina se adsorbe sobre el soporte sólido y luego se une un conjugado de biotina-compuesto quimioluminiscente. En otro ejemplo, se adsorbe o se une covalentemente un compuesto quimioluminiscente conjugado con una proteína auxiliar, tal como albúmina, sobre el soporte sólido. En otro ejemplo, se adsorbe o une covalentemente un compuesto quimioluminiscente conjugado con un anticuerpo sobre el soporte sólido.

El soporte sólido puede ser de diversos materiales, porosidad, formas y tamaños tales como placas de micropocillos que tienen 96 pocillos, 384 pocillos o más, pocillos, tubos de ensayo, recipientes para muestras, esferas de plástico, tiras reactivas de celulosa, papel o plástico, partículas de látex, partículas poliméricas que tienen diámetros de 0,10-50 μm , partículas de sílice que tienen diámetros de 0,10-50 μm , partículas magnéticas, especialmente aquellas que tienen diámetros medios de 0,1-10 μm y nanopartículas. En una realización, el soporte sólido comprende partículas poliméricas o de sílice que tienen diámetros de 0,10-50 μg y pueden ser partículas magnéticas como se ha definido anteriormente.

El compuesto quimioluminiscente inmovilizado de la presente invención comprende un marcador quimioluminiscente fijado al soporte sólido en donde el marcador quimioluminiscente se proporciona por un compuesto marcador quimioluminiscente que tiene la fórmula general CL-L-RG, en donde CL representa un resto quimioluminiscente, L representa un resto de unión para unir el resto quimioluminiscente a un grupo reactivo y RG representa un resto de grupo reactivo para el acoplamiento a otro material. El resto 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 resto quimioluminiscente incluye cada clase de compuesto que se ha descrito anteriormente bajo el encabezado "Compuestos marcadores quimioluminiscentes" incluidos, sin limitación, luminol e hidrazidas cíclicas estructuralmente relacionadas, ésteres de acridano, tioésteres y sulfonamidas y compuestos acridano cetenoditioacetales.

En otra realización de la presente invención, se proporcionan materiales de ensayo que comprenden un soporte sólido que tiene inmovilizado en el mismo un compuesto quimioluminiscente y al menos una sustancia de unión específica que tiene afinidad de unión específica para un analito o que tiene afinidad de unión específica para otra sustancia que tiene afinidad de unión específica para un analito. En estas realizaciones, el compuesto quimioluminiscente inmovilizado es como se describe inmediatamente antes para realizaciones que comprenden un soporte sólido que tiene un compuesto quimioluminiscente inmovilizado en el mismo. Las sustancias de unión específica inmovilizadas se unen directa o indirectamente a un analito a través de una o más reacciones específicas de unión de afinidad. 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.

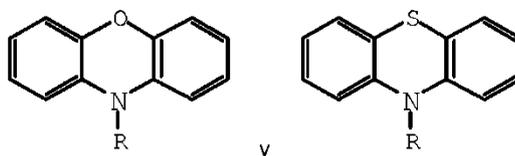
También se describe en la presente memoria un sistema de señalización formado en un ensayo que comprende un soporte sólido que tiene inmovilizado en el mismo 1) un compuesto quimioluminiscente, 2) al menos una sustancia de unión específica que tiene afinidad de unión específica para un analito o que tiene afinidad de unión específica para otra sustancia que tiene afinidad de unión específica para un analito, 3) un analito y 4) un conjugado activador. El significado de las expresiones "soporte sólido", "compuesto quimioluminiscente" y "sustancia de unión específica" y las realizaciones incluidas en estas expresiones, es idéntico a los significados y realizaciones que se han establecido anteriormente para los materiales de ensayo considerados como composiciones de la presente invención. Los analitos que pueden formar un elemento de los presentes sistemas de señalización incluyen cualquiera de los analitos identificados anteriormente, cuya presencia, localización o cantidad se determinará en un ensayo. El conjugado activador comprende un compuesto activador unido a un conjugado de compañero de unión específica para el analito. El conjugado tiene una doble función: 1) unirse específicamente al analito en el ensayo a través de la porción de compañero de unión específica, directamente o a través de un compañero de unión específica intermedio y 2) activar el compuesto quimioluminiscente en la porción de activador. La porción del compuesto activador del conjugado 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 el activador incluyen compuestos con actividad tipo peroxidasa incluidos sales de metales de transición y complejos y enzimas, especialmente enzimas que contienen metales de transición, especialmente enzimas peroxidásas. Los metales de transición útiles en los compuestos activadores incluyen los grupos 3-12 de la tabla periódica, en especial hierro, cobre, cobalto, cinc, manganeso y cromo. Las peroxidásas que pueden ser sometidas a la reacción de quimioluminiscencia incluyen, p. ej., lactoperoxidasa, microperoxidasa, mieloperoxidasa, haloperoxidasa, vanadio bromoperoxidasa, peroxidasa de rábano picante, peroxidásas fúngicas, lignina peroxidasa, peroxidasa de *Arthromycesramosus*, peroxidasa dependiente de Mn producida en hongos de podredumbre blanca y peroxidasa de soja. Otros compuestos que poseen actividad tipo peroxidasa incluyen complejos de hierro, tales como hemo y Mn-TPPS₄.

Solución activadora

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 se puede variar dentro de un intervalo de valores, típicamente de aproximadamente 10^{-8} M a aproximadamente 3 M, más comúnmente de aproximadamente 10^{-3} M a aproximadamente 10^{-1} M. Una realización representativa usa un conjugado de peroxidasa como activador, un compañero de unión específica marcado con acridano de un analito en donde el marcador de acridano se proporciona haciendo reaccionar el compuesto de unión específica con un compuesto de fórmula III anterior 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 el marcador de acridano mantenido 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 encuentran compuestos fenólicos y aminas aromáticas conocidas para potenciar otras reacciones de peroxidasa como se describe en las patentes US-5.171.668 y US-5.206.149. También se considera que los compuestos de ácido arilborónico sustituidos y no sustituidos y sus derivados de éster y anhídrido, como se desvela en US-5.512.451, están dentro del alcance de potenciadores útiles en la presente invención. Los potenciadores 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 se han encontrado eficaces para potenciar la producción de quimioluminiscencia de los compuestos de la presente invención son derivados de fenoxazina y fenotiazina que tienen las siguientes fórmulas.



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 invención 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. Los 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.

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 tensoactivos no iónicos útiles en la práctica de la presente invención 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 fosfonio cuaternario. Los surfactantes catiónicos poliméricos incluidos aquellos que comprenden los grupos de sales de amonio cuaternario y fosfonio 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.

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 placa de micropocillos alojada en un luminómetro o colocada delante de una cámara CCD en una carcasa adaptada 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. Los tipos de sustancias que se pueden analizar mediante inmunoensayo según la presente invención incluyen proteínas, péptidos, anticuerpos, haptenos, medicamentos, esteroides y otras sustancias que son generalmente conocidas en la técnica de los inmunoensayos.

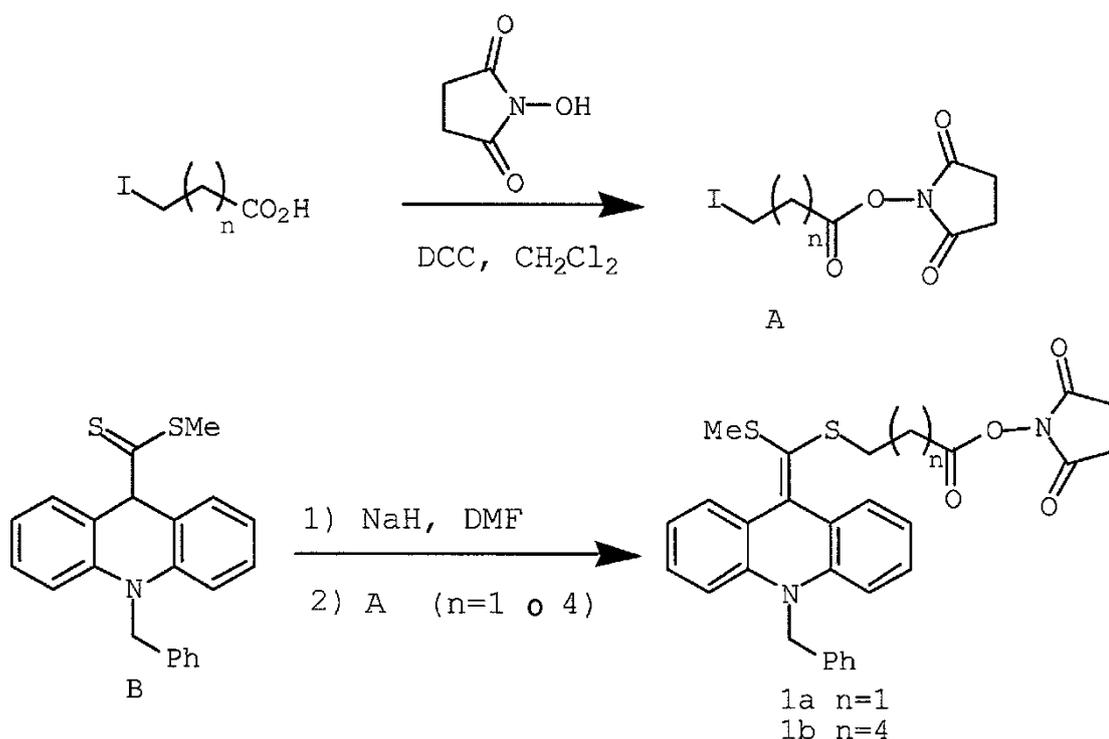
Los métodos de la presente invención son también útiles para la detección de ácidos nucleicos. En una realización un método hace uso de sondas de ácido nucleico marcado con enzimas. Métodos ilustrativos incluyen ensayos de hibridación en solución, detección de ADN en Southern blot, ARN en Northern blot,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

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.

La presente invención también contempla proporcionar kits para llevar a cabo ensayos según los métodos de la presente invención. Los kits pueden comprender, en combinación envasada, marcadores quimioluminiscentes, ya sea como compuestos marcadores libres, compañeros de unión específica marcados quimioluminiscentes, soportes sólidos derivados quimioluminiscentes, tales como partículas o microplacas o sustancias auxiliares marcadas quimioluminiscentes, tales como proteínas de bloqueo, junto con una 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.

Ejemplos

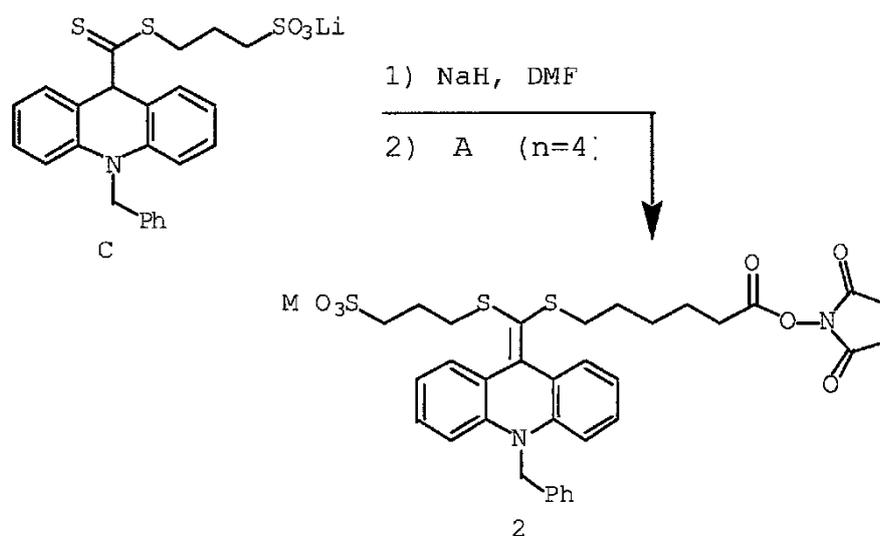
Ejemplo 1. Síntesis del compuesto 1.



5 El yodocarboxilato NHS éster se sintetizó haciendo reaccionar los ácidos yodocarboxílicos con N-hidroxisuccinimida usando DCC como el reactivo de acoplamiento. Se preparó el compuesto **B** usando los métodos descritos en la publicación de solicitud estadounidense 2005/0158815.

10 A una solución de ditioéster **B** (1,808 g, 5,00 mmol) en DMF anhidra (50 ml) se le añadió NaH (60 % en aceite mineral, 0,200 g, 5,00 mmol) en una atmósfera de argón. Después de 4 h a temperatura ambiente, se añadió NHS 3-yodopropionato **A** (1,485 g, 5,00 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante una noche. La DMF se eliminó *invacuo*. La cromatografía en columna con CH₂Cl₂/EtOAc (40:1) proporcionó 1,770 g de **1** en forma de un sólido de color amarillo (rendimiento del 67 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2,30 (s, 3H), 2,74 (t, 2H), 2,83 (s, 4H), 3,01 (t, 2H), 5,31 (s, 2H), 6,88 (t, 2H), 7,07 (m, 2H), 7,11-7,18 (m, 3H), 7,27 (m, 4H), 7,82 (dd, 1H), 7,89 (dd, 1H) ppm.

15 Ejemplo 2. Síntesis del compuesto 2.



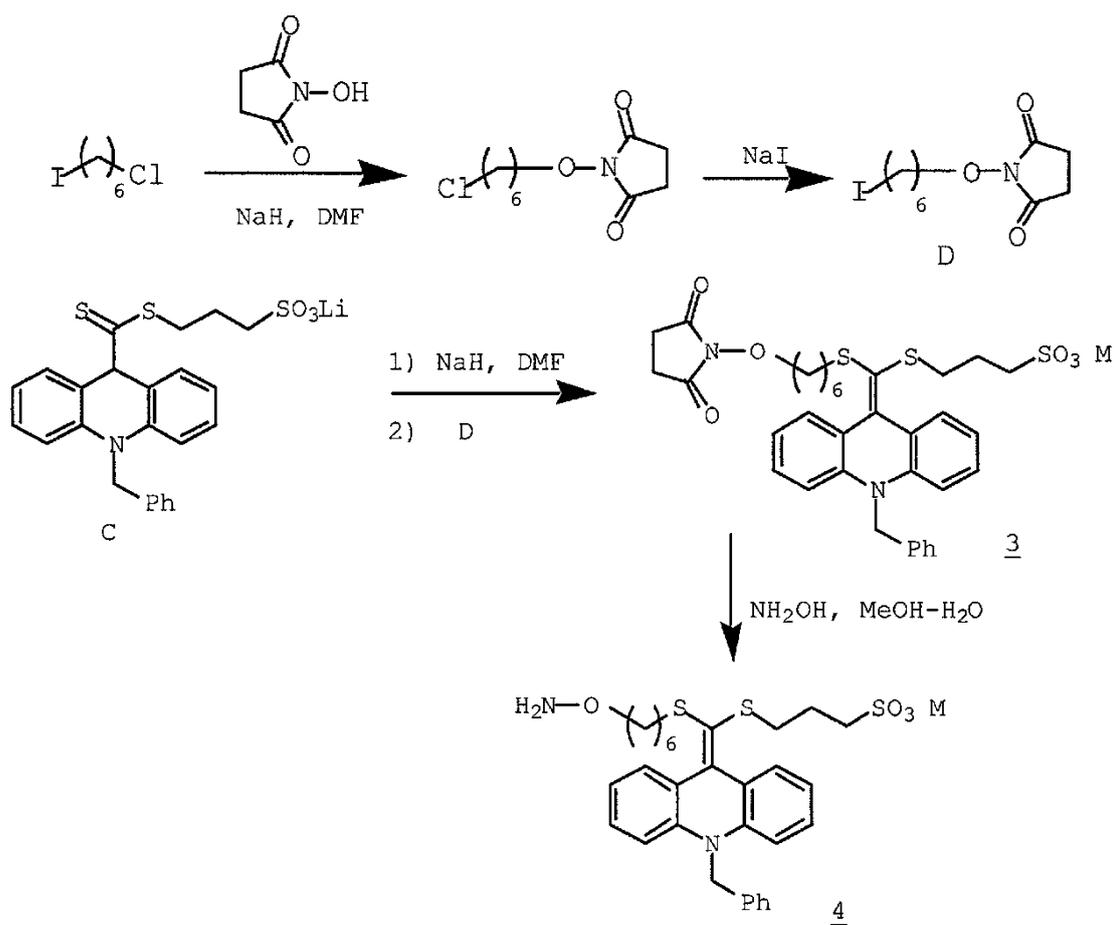
20 Se preparó el compuesto **C** usando los métodos descritos en la publicación de solicitud estadounidense 2005/0158815. Una mezcla de ditioéster **C** (0,692 g, 1,50 mmol) y NaH (60 % en aceite mineral, 0,060 g, 1,50 mmol) en DMF anhidra (20 ml) se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 4 horas, dando como resultado una solución ligeramente turbia. Después, se añadió NHS 6-yodohexanoato **A** (n = 4) (0,661 g, 1,95 mmol) en 5 ml de DMF. Después de 16 h, se eliminó la DMF *invacuo*. Al residuo se le añadieron 10 ml de acetona seguido

de 20 ml de éter. El sobrenadante se decantó. El precipitado se lavó tres veces siguiendo el mismo procedimiento. Después del secado al vacío, se obtuvieron 1,200 g de 2 en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,15 (m, 2H), 1,33-1,47 (m, 4H), 2,01 (p, 2H), 2,38 (t, 2H), 2,67 (t, 2H), 2,75 (t, 2H), 2,82 (s, 4H), 2,88 (t, 2H), 5,32 (s, 2H), 6,88-6,93 (m, 2H), 7,00 (t, 2H), 7,08-7,28 (m, 7H), 7,83 (d, 1H), 7,92 (d, 1H) ppm.

5

10

Ejemplo 3. Síntesis de los compuestos 3 y 4.



15

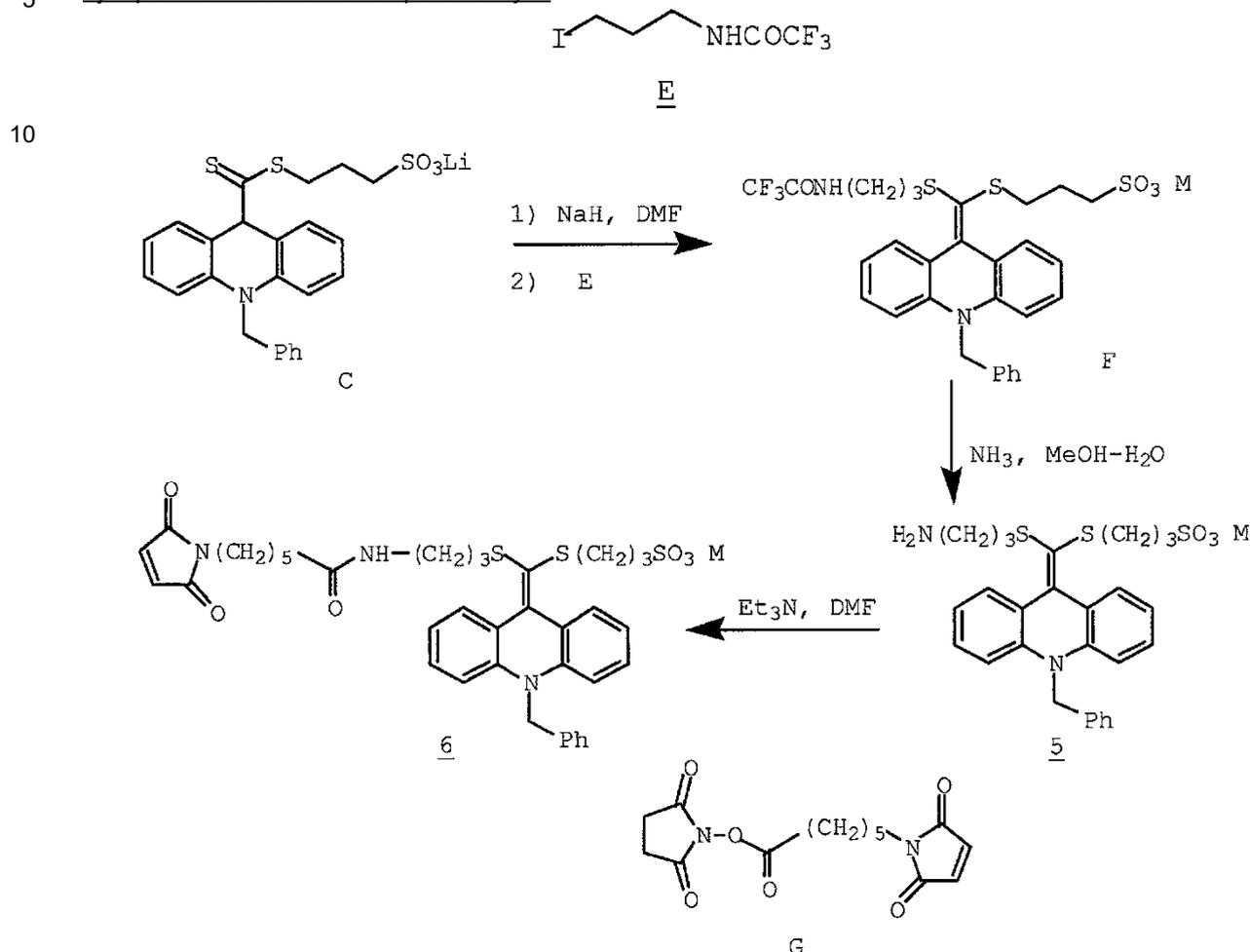
Una mezcla de ditioéster C (1,00 g, 2,10 mmol) y NaH (60 % en aceite mineral, 0,087 g, 2,16 mmol) en DMF anhidra (20 ml) se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 4 horas, dando como resultado una solución ligeramente turbia. Después, se añadió N-6 yodohexisuccinimida D (0,82 g, 2,52 mmol) en 5 ml de DMF. La mezcla se agitó durante una noche, después de lo cual la DMF se eliminó al vacío. El residuo se lavó cuatro veces con 30 ml de éter, dando 1,35 g de 3.

20

El compuesto 3 (0,25 g) se disolvió en 5 ml de metanol, al que se le añadieron 5,0 ml de NH₂OH ac. al 50 %. Después de agitar la solución durante 2 días, los disolventes se evaporaron al vacío. El residuo se lavó con 6 x 20 ml de éter, dando 0,21 g de 4. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,14 (m, 4H), 1,40 (m, 4H), 1,94 (p, 2H), 2,65-2,71 (m, 4H), 2,84 (t, 2H), 3,55 (t, 2H), 5,31 (s, 2H), 6,88 (d, 2H), 6,98 (c, 2H), 7,10 (m, 4H), 7,12-7,27 (m, 3H), 7,85 (t, 2H) ppm.

25

30

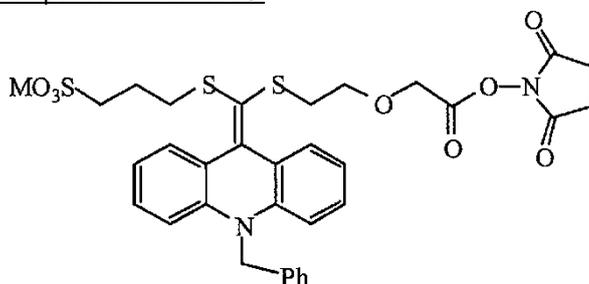
5 Ejemplo 4. Síntesis de los compuestos 5 y 6.

Una mezcla de ditioéster C (1,32 g, 2,78 mmol) y NaH (60 % en aceite mineral, 0,114 g, 2,86 mmol) en 30 ml de DMF anh. se agitó en una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 4 horas. Después, se añadió el compuesto E (1,014 g, 3,61 mmol) en 10 ml de DMF. La mezcla se agitó durante una noche, después de lo cual la DMF se eliminó al vacío. El residuo se lavó tres veces con 20 ml de éter, dando 2,10 g de E.

El compuesto E (2,25 g) se disolvió en una mezcla de 15 ml de NH₃ 7 N en MeOH y 10 ml de amoníaco acuoso al 28 %. Después de 3 días de agitación, los disolventes se eliminaron al vacío. El residuo se lavó con éter (3 x 50 ml) y se recristalizó con H₂O/2-propanol, dando 1,20 g de 5.

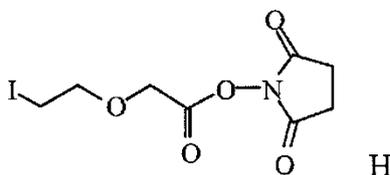
A una suspensión de 5 (0,300 g, 0,563 mmol) en 9,0 ml de DMF seca se le añadieron 1,20 ml de trietilamina. La mezcla se agitó durante 5 min, dando una solución ligeramente turbia. A ésta se le añadió NHS éster 6-maleimidohexanoico (G 0,260 g, 0,843 mmol). Dio como resultado una solución transparente en 5 min. Después de 16 h, la DMF se eliminó al vacío. El residuo se lavó con éter (4 x 30 ml), después se disolvió en MeOH (2 ml) y precipitó con éter (50 ml). Se obtuvo un rendimiento de 0,400 g de 6 en forma de un sólido tipo espuma de color amarillento. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 1,26 (t, 11H), 1,49-1,58 (m, 6H), 1,90 (p, 2H), 2,08 (t, 2H), 2,68 (m, 4H), 2,80 (t, 2H), 3,00 (t, 2H), 3,15 (c, 6H), 3,42 (t, 2H), 5,28 (s, 2H), 6,73 (s, 2H), 6,85 (d, 2H), 6,96 (m, 2H), 7,07 (m, 4H), 7,18-7,25 (m, 3H), 7,83 (m, 2H) ppm.

5

Ejemplo 7. Preparación del compuesto marcador 15.

15

10 El compuesto C del Ejemplo 4, después de la formación del anión enotiolato con NaH en DMF, se S-alkiló con yodo NHS éster H. El producto se purificó por recristalización en 2-propanol.



H

15 Ejemplo 8. Preparación de anticuerpo marcado con acridano. El compuesto marcador de acridano 3 del Ejemplo 3 se usó para marcar IgG de oveja anti-ratón (H + L) (Jackson Immunoresearch). Una solución de 0,24 mg del anticuerpo en tampón borato 0,1 M, pH 8,25 y el compuesto 3 en 500 µl de DMF (relación molar 10:1 de 3:anticuerpo) se hizo reaccionar durante 15 min a temperatura ambiente y después a 4 °C durante una noche. La solución se pasó a través de una columna desaladora (BioRad) eluida con tampón PBS para eliminar el marcador no unido. El anticuerpo marcado, junto con el anticuerpo sin reaccionar, se obtuvo recogiendo fracciones de 500 µl.

20 Las fracciones se ensayaron para determinar la cantidad del anticuerpo marcado por un ensayo quimioluminiscente. Una alícuota de 1 o 10 µl se mezcló con 50 µl de HCl 0,4 M + peróxido de urea al 3,6 % seguido de inyección de 50 µl de NaOH 0,5 M en un tubo en un luminómetro Turner Designs TD-20e. La intensidad integrada total de la ráfaga de luminiscencia se midió desde el momento de la inyección. Se conservaron las fracciones que mostraban quimioluminiscencia. La fracción 8 contenía la cantidad máxima de producto.

25 Ejemplo 9. Preparación de BSA marcada con acridano. El compuesto marcador de acridano 3 del Ejemplo 3 se usó para marcar la albúmina sérica bovina (BSA). Una solución de 0,1 g de BSA en 500 µl de tampón borato 0,1 M, pH 8,25 y 42 µl de una solución que contenía 23,4 mg del compuesto 3 en 100 µl, DMF (relación molar 10:1 de 3:BSA) se hizo reaccionar durante 15 min a temperatura ambiente y después a 4 °C durante una noche. La solución se pasó a través de una columna desaladora (BioRad) eluida con tampón PBS para eliminar el marcador no unido. Se obtuvo BSA marcada junto con cualquier BSA sin reaccionar recogiendo fracciones de 500 µl.

30 Las fracciones se ensayaron para determinar la cantidad de BSA marcado por el ensayo quimioluminiscente del Ejemplo 8. Se conservaron las fracciones que mostraban quimioluminiscencia. La fracción 7 contenía la cantidad máxima de producto.

35 Ejemplo 10. Preparación de micropocillos funcionalizados con acridano. Se acoplaron microplacas de 96 pocillos de poliestireno de color blanco funcionalizados con grupos de ácidos carboxílicos (Biosystems) con el compuesto 5 usando EDC como agente de acoplamiento. Se preparó una solución madre del compuesto 5 en una solución 70:30 (v/v) de DMF y tampón MES 0,1 M, pH 4. Se añadió una alícuota de 0,2 ml a cada pocillo de la placa que se había lavado previamente en tampón MES. Se añadió EDC en tampón MES y la mezcla reaccionó durante una noche. El sobrenadante se eliminó y los pocillos se lavaron secuencialmente dos veces con agua y seis veces con metanol.

40 Ejemplo 11. Preparación de micropartículas de poli(metacrilato) marcadas con acridano.

45 Una resina Amberlite (IRP-64, 149-37 micrómetros (malla 100-400), 2,50 g) se hizo reaccionar con SOCl₂ a reflujo durante cuatro horas. La reacción se enfrió y los volátiles se eliminaron al vacío. Después, las perlas se suspendieron en 50 ml de CH₂Cl₂ a las que se añadieron 17,0 ml de trietilamina seguido de 15,0 ml de etilendiamina. La mezcla se agitó en una atmósfera de Ar durante una noche. Las partículas se dispersaron mediante la adición de

50

100 ml de MeOH y después se filtraron. Las partículas filtradas se lavaron con MeOH y CH_2Cl_2 y después se secaron al aire. Las partículas resultantes pesaron 2,80 g para un contenido de NH_2 calculado de 2,86 mmol/g.

5 Las partículas modificadas con etilendiamina, 100 mg en 10 ml de DMF anhidra, se agitaron en una atmósfera de Ar con 10 mg del compuesto 2 a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró y las partículas se lavaron con MeOH. Después del secado al aire, las partículas funcionalizadas recuperadas pesaban 102 mg.

10 En un método alternativo, 2,50 g de resina Amberlite se convirtieron en la forma de cloruro de ácido por reacción con SOCl_2 como anteriormente y después se hicieron reaccionar con 4,32 g de N-hidroxisuccinimida en 50 ml de THF y 6,8 ml de trietilamina para preparar las partículas funcionalizadas con NHS éster. Éstas se hicieron reaccionar con el compuesto 5 que contenía un grupo terminal NH_2 libre para realizar el acoplamiento.

Ejemplo 12. Conjugación de micropartículas marcadas con acridano con anticuerpo.

15 Una cantidad de 20 mg de las partículas Amberlite marcadas con acridano del Ejemplo 11, que contenían grupos NH_2 terminales sin reaccionar, se hizo reaccionar adicionalmente con 102 mg de octanodioato de disuccinimidilo (~5 equiv.) en 1 ml de DMF anh. durante 15 min a temperatura ambiente. Las partículas se separaron por centrifugación y se lavaron con 10 x 1 ml de DMF. El NHS éster libre resultante se acopló a IgG de oveja anti-ratón (0,5 ml de una solución madre de 18 kg/m^3 (1,8 mg/ml)) en tampón borato 0,1 M, pH 8,5, EDTA 2 mM durante una noche a 4 °C. La mezcla de reacción se centrifugó a 13k rpm y el sobrenadante se eliminó. Las partículas se lavaron varias veces en una columna giratoria con PBS + Tween-20 al 0,05 %.

20 Las partículas marcadas con anticuerpo resultantes se bloquearon con BSA por incubación en 1,0 ml de tampón de bloqueo (BSA al 1 %, sacarosa al 1 % en 1X PBS) a 37 °C durante 1 hora. Las partículas se lavaron con tampón de lavado Tween-PBS y se almacenaron en 1,0 ml de 1X PBS.

30 Ejemplo 13. Preparación de micropartículas magnéticas marcadas con acridano. Se preparó una solución madre de 4 mg del compuesto 5 en una solución de 0,7 ml de DMF y 0,3 ml de tampón MES 0,1 M, pH 4. Se añadió un alícuota de 0,1 ml a 50 mg de partículas de poliestireno carboxilado (ácido carboxílico Dynal Dynabeads M-270), que se habían lavado en un tampón MES. La mezcla se diluyó con 0,67 ml de tampón MES y 0,23 ml de DMF. Se añadió EDC (23 mg) y la mezcla se agitó durante una noche. El sobrenadante se eliminó y las partículas se lavaron secuencialmente con 2 x 1 ml de agua y 6 x 1 ml de MeOH y se suspendieron de nuevo en 1 ml de MeOH.

35 Las partículas se ensayaron para determinar la incorporación del marcador. Una alícuota de 10 μl (que contenía aprox. 0,5 mg de partículas) se añadió a 0,5 ml de agua para preparar una solución madre de 1 kg/m^3 (1 mg/ml). Una alícuota de 100 μl se hizo reaccionar con un exceso de HRP durante 5 min. Las partículas se lavaron con 4 x 1 ml de agua y después se suspendieron en 1 ml de agua. La solución activadora 1 (10 μl) que contenía tris 25 mM, pH 8,0, ácido p-hidroxycinnámico 8 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,2 % y peróxido de urea 0,1 M se inyectó y el destello de la quimioluminiscencia se registró en un luminómetro. Se observó una señal de 6040 URL en comparación con un blanco de 18 URL.

40 Una porción de 5 mg de partículas se lavó con 2 x 200 μl de tampón MES 0,1 M, pH 4 y se suspendió de nuevo en 117 μl de tampón MES. Se añadió IgG de oveja anti-ratón (0,15 mg de una solución madre de 18 kg/m^3 (1,8 mg/ml)) a las partículas y la mezcla se agitó durante 30 minutos. Se añadió EDC, 5 mg y la mezcla se agitó durante 4 horas. El sobrenadante se eliminó y las perlas se lavaron con 3 x 500 μl de PBS-T (PBS + Tween-20 al 0,05 %). Las partículas se suspendieron de nuevo en 500 μl de tampón de bloqueo (PBS + BSA al 1 % + sacarosa al 1 %) y 5 mg de EDC, se agitaron durante 15 min a temperatura ambiente y se agitaron a 4 °C durante una noche. El sobrenadante se eliminó y las partículas se lavaron con 2 x 500 μl de PBS-T y se suspendieron de nuevo en 1 ml de PBS.

50 Ejemplo 14. Inmunoensayo de microplacas usando anticuerpo de captura marcado. La fracción que contenía producto de la preparación del anticuerpo marcado en el Ejemplo 8 se diluyó 1:100 en tampón PBS. Se añadió una alícuota de 50 μl a cada uno de los 26 pocillos de una placa de 96 pocillos de poliestireno de color blanco. La placa se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. La solución se eliminó y los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T, eliminando todo el tampón de lavado después de cada etapa.

60 El conjugado de $\text{F}(\text{ab}^1)_2$ de IgG de oveja anti-ratón-HRP (Jackson Immunoresearch) se diluyó $1:1,2 \times 10^6$ en un tampón de conjugado que comprendía BSA al 2,5 % y sacarosa al 1 % en 1X PBS. Como alternativa, el conjugado también puede diluirse en otras matrices tales como FBS. Las alícuotas de conjugado diluido se distribuyeron en los 26 pocillos. Se prepararon patrones de IgG que contenían de 100 mg/m^3 - 48 mg/m^3 (100 ng/ml - 0,048 ng/ml) por dilución de 2 veces junto con una solución de 0 mg/m^3 (0 ng/ml) en una solución de conjugado anti-IgG $\text{F}(\text{ab}^1)_2$ -HRP. Los patrones y cero se dispensaron en pocillos logrando un volumen final de 50 μl /pocillo. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en el agitador de placas.

65 La placa se transfirió a un luminómetro de placa Luminoskan. Sin eliminar la solución de conjugado, se generó luminiscencia inyectando secuencialmente 100 μl de la solución activadora 1 y leyendo la intensidad integrada en

cada pocillo durante 5 segundos. Se muestra una gráfica del ensayo resultante en la Figura 4. El ensayo permitió una cuantificación sobre todo el intervalo ensayado excediendo el calibrador inferior la señal del cero + 2 desviaciones estándar del cero.

5 Ejemplo 15. Inmunoensayo de microplacas usando anticuerpo de captura no marcado y BSA marcada. Se añadió una alícuota de 50 μl de IgG de oveja anti-ratón IgG (H + L) no marcada, 40 g/m^3 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de 1X PBS, para cubrir cada uno de los 26 pocillos de una placa de 96 pocillos de poliestireno de color blanco. La placa se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. La solución se eliminó y los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T, eliminando todo el tampón de lavado después de cada etapa.

10 La fracción que contenía producto de la preparación de BSA marcada en el Ejemplo 9 se diluyó a 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ con tampón PBS + sacarosa al 1 %. Se añadió una alícuota de 100 μl a cada uno de los 26 pocillos de la placa de 96 pocillos de poliestireno de color blanco. La placa se mantuvo durante 1 h a 37 °C. La solución se eliminó y los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T, eliminando todo el tampón de lavado después de cada etapa.

15 El conjugado de $\text{F}(\text{ab}^1)_2$ de IgG de oveja anti-ratón-HRP se diluyó 1:1,2 x 10⁶ en un tampón de conjugado que comprendía BSA al 1 % y sacarosa al 1 % en 1X PBS. Las alícuotas de conjugado diluido se distribuyeron en los 26 pocillos. Se prepararon patrones de IgG que contenían de 100 mg/m^3 - 48 mg/m^3 (100 ng/ml - 0,048 ng/ml) por dilución de 2 veces junto con una solución de 0 mg/m^3 (0 ng/ml) en una solución de conjugado anti-IgG $\text{F}(\text{ab}^1)_2$ -HRP. Los patrones y cero se dispensaron en pocillos logrando un volumen final de 50 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en el agitador de placas.

20 La placa se transfirió a un luminómetro de placa Luminoskan. Sin eliminar la solución de conjugado, se generó luminiscencia inyectando secuencialmente 100 μl de la solución activadora 1 y leyendo la intensidad integrada en cada pocillo durante 5 segundos. Se muestra una gráfica del ensayo resultante en la Figura 5. El ensayo permitió una cuantificación sobre todo el intervalo ensayado excediendo el calibrador inferior la señal del cero + 2 desviaciones estándar del cero.

25 En un experimento de control, la eliminación de la solución de un pocillo y el análisis de la solución mostró que la emisión de luz se originó desde la superficie del pocillo y no desde la solución.

30 Ejemplo 16. Inmunoensayo de micropartículas usando micropartículas magnéticas marcadas.

35 Una cantidad de acridano y micropartículas magnéticas co-marcadas con anticuerpo del Ejemplo 13 suficiente para proporcionar 50 μg por reacción se lavó tres veces con PBS-T y se suspendió de nuevo en conjugado IgG de oveja anti-ratón $\text{F}(\text{ab}^1)_2$ -HRP diluido 1:1,2 x 10⁶ en 1X tampón PBS que contenía BSA al 1 % y sacarosa al 1 %. La suspensión de partículas se dispuso en 26 pocillos de una placa de 96 pocillos de poliestireno de color blanco. Se prepararon patrones de IgG en una solución de conjugado de $\text{F}(\text{ab}^1)_2$ de IgG de oveja anti-ratón-HRP por dilución seriada por duplicado para dar lugar a concentraciones finales de 100 mg/m^3 - 48 mg/m^3 (100 ng/ml - 0,048 ng/ml) o 0 mg/m^3 (0 ng/ml) en los pocillos. Los patrones respectivos y cero se dispensaron 20 en pocillos para hacer un volumen de reacción final de 50 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador de placas.

40 La placa se transfirió a un luminómetro de placa Luminoskan. Sin eliminar la solución de conjugado, se generó luminiscencia inyectando secuencialmente 100 μl de la solución activadora 1 y leyendo la intensidad integrada en cada pocillo durante 5 segundos, Un gráfico del ensayo resultante permitió la cuantificación de la IgG.

45 Ejemplo 17. Inmunoensayo de micropartículas usando micropartículas Amberlite marcadas.

50 Una cantidad de acridano y micropartículas magnéticas co-marcadas con anticuerpo del Ejemplo 13 suficiente para proporcionar 100 μg por reacción se lavó tres veces con PBS-T y se suspendió de nuevo en conjugado de $\text{F}(\text{ab}^1)_2$ de IgG de oveja anti-ratón-HRP diluido 1:1,2 x 10⁶ en 1X tampón PBS que contenía BSA al 1 % y sacarosa al 1 %. La suspensión de partículas se dispuso en 26 pocillos de una placa de 96 pocillos de poliestireno de color blanco. Se prepararon patrones de IgG en una solución de conjugado de $\text{F}(\text{ab}^1)_2$ de IgG de oveja anti-ratón-HRP por dilución seriada por duplicado para dar lugar a concentraciones finales de 100 mg/m^3 - 48 mg/m^3 (100 ng/ml - 0,048 ng/ml) o 0 mg/m^3 (0 ng/ml) en los pocillos. Los patrones respectivos y cero se dispensaron en pocillos para hacer un volumen de reacción final de 50 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador de placas.

55 La placa se transfirió a un luminómetro de placa Luminoskan. Sin eliminar la solución de conjugado, se generó luminiscencia inyectando secuencialmente 100 μl de la solución activadora 1 y leyendo la intensidad integrada en cada pocillo durante 5 segundos. Un gráfico del ensayo resultante permitió la cuantificación de la IgG.

60 Ejemplo 18. Preparación de micropartículas modificadas con carboxilo marcadas con acridano. Se conjugaron micropartículas de 1 μm de poliestireno modificadas con ácido carboxílico (Seradyn) que tenía una carga de carboxilo de 0,0282 mequiv./g con el compuesto 5 por acoplamiento de EDC de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 13. Una porción de 52,5 mg de las partículas (1,48 μmol COOH) se trató con 0,39 mg de 5

(0,74 μmol) para asegurar que se mantuvieran algunos grupos COOH sin reaccionar. Los grupos COOH libres se acoplaron a IgG de oveja anti-ratón (1,48 μmol) por acoplamiento de EDC en tampón MES pH 4. El anticuerpo sin reaccionar se eliminó por lavado con tampón PBS-T usando una columna giratoria.

5 Ejemplo 19. Preparación de micropartículas de sílice magnéticas modificadas marcadas con acridano.

La magnetita obtenida comercialmente (10,0 g) que tenía un intervalo de tamaño de partícula de 1-5 μm se recubrió mediante un proceso de Stöber con una mezcla de ortosilicato de tetraetilo (27,0 g) y 3-aminopropil-trietoxisilano (3,0 g). Posteriormente se realizó un recubrimiento adicional con 3,75 g de 3-aminopropiltriethoxisilano.

10 Las partículas de sílice magnéticas modificadas con aminopropilsilano se hicieron reaccionar con el compuesto 2 del Ejemplo 2 como se indica a continuación. Una porción de 25 mg de las partículas magnéticas funcionalizadas con aminopropilo se mezcló con 1 ml de DMF en un tubo de centrifuga de 1,5 ml. Una alícuota de 5 μl de una solución de 1 kg/m^3 (1 mg/ml) de compuesto 2 en DMF se añadió a la suspensión de partículas y la mezcla se agitó en un
15 agitador durante una noche. El sobrenadante se eliminó en un bastidor magnético y las partículas se lavaron secuencialmente con varias porciones de metanol seguido de varias porciones de DMF.

Ejemplo 20. Inmunoensayo tipo Sándwich de TSH usando micropartículas de sílice magnéticas modificadas marcadas con acridano. Las partículas marcadas con acridano del Ejemplo 19 se unieron covalentemente a un anticuerpo anti-TSH de ratón activando las partículas con una solución de 128 mg del disuccinimidiloxisuberato de enlazador homobifuncional (DSS) en 1,2 ml de DMF durante 25 minutos. El sobrenadante se eliminó en un bastidor magnético y las partículas se lavaron con DMF. Las partículas activadas se acoplaron al anticuerpo añadiendo una solución de 0,225 mg de anticuerpo en tampón borato 0,1 M, pH 8,25 y agitando la mezcla durante 45 minutos antes de almacenar 4 °C durante una noche. Las partículas recubiertas con anticuerpo resultantes se lavaron con PBS-T y después se bloquearon en tampón PBS que contenía BSA al 1 % y sacarosa al 1 % durante 1 h a 37 °C. Las partículas se lavaron en tampón PBS-T seguido de lavado con PBS y se almacenaron como una suspensión de 20 kg/m^3 (20 mg/ml) en tampón PBS.

30 Se empleó una microplaca de poliestireno de color blanco para contener las partículas y se proporcionó un recipiente de reacción para los inmunoensayos. Los pocillos se bloquearon antes del uso con tampón PBS que contenía BSA al 1 % y sacarosa al 1 % (bloqueo al 1 %) y se lavaron con PBS-T. Una solución madre de 1 kg/m^3 (1 mg/ml) de conjugado de cabra anti-TSH-HRP (anticuerpo señal) se diluyó 1: 15.000 en bloqueo al 1 %. Una solución madre estándar de TSH que tenía una concentración de 100 $\mu\text{UI}/\text{ml}$ se diluyó en serie en diluciones 1:2 con respecto a 0,00076 $\mu\text{UI}/\text{ml}$. Las partículas se separaron del tampón de almacenamiento y se suspendieron de nuevo
35 en una solución de conjugado de HRP. Las alícuotas de la suspensión de partículas que contenía 0,1 mg de partículas se añadieron a un número suficiente de pocillos para permitir ensayos duplicados sobre el intervalo de concentración deseado, típicamente 12,5 - 0,002 $\mu\text{UI}/\text{ml}$. Se distribuyeron patrones de TSH en el pocillo. Se añadió un blanco que comprendía bloqueo o suero fetal bovino (FBS) al 1 % para duplicar los pocillos. La placa se cubrió con un sellador de placas y se incubó con agitación a 37 °C durante 1 hora. Se leyó la luminiscencia inyectando la
40 solución activadora 2 y midiendo la luz durante 2 o 5 segundos de manera secuencial. La solución activadora 2 contenía tris 25 mM, pH 8,0, ácido p-hidroxicinámico 8 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,2 % y peróxido de urea 5 mM.

Conc. de TSH $\mu\text{UI}/\text{ml}$	Señal-Blanco
12,5	196,5
6,25	140,9
3,13	88,3
1,56	47,4
0,78	24,1
0,39	11,5
0,20	6,39
0,097	3,46
0,048	2,02

45 Ejemplo 21. Preparación de micropartículas de poliestireno modificadas marcadas con acridano. Las micropartículas de poliestireno funcionalizado con amina Dynal M-270 se funcionalizaron con el compuesto 2 marcador de acridano y anticuerpo de ratón anti-TSH como se describe en los Ejemplos 19 y 20.

50 Ejemplo 22. Inmunoensayo tipo Sándwich para TSH usando partículas de poliestireno modificadas marcadas con acridano. Las partículas del Ejemplo 21 se usaron para realizar un inmunoensayo de tipo sándwich para TSH de acuerdo con el protocolo general del Ejemplo 20.

Conc. de TSH $\mu\text{UI/ml}$	Señal-Blanco
12,5	588,6
6,25	303,6
3,13	149,7
1,56	68,43
0,78	30,66
0,39	13,89
0,20	6,95
0,097	3,31
0,048	1,50
0,024	0,925

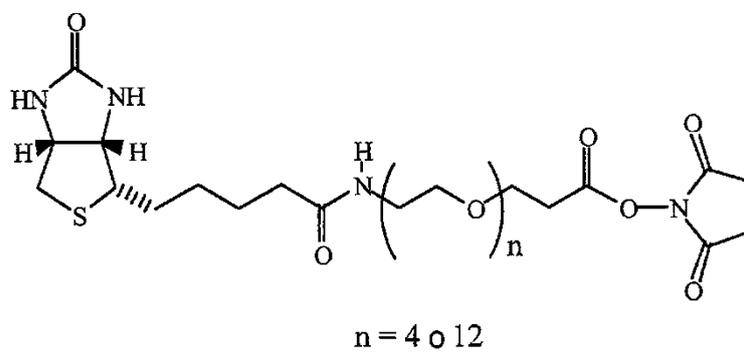
Ejemplo 23. Preparación de micropartículas de poliestireno modificadas marcadas con acridano. Las micropartículas de poliestireno magnéticas funcionalizadas con amina Dynal M-270 se funcionalizaron con compuesto 2 marcador de acridano como se indica a continuación. Se eliminó una alícuota de la suspensión de partículas, el sobrenadante se decantó y las partículas se lavaron secuencialmente con agua, acetonitrilo y DMF. Una porción de 25 mg de las partículas se mezcló con 1 ml de DMF en un tubo de centrifuga de 1,5 ml. Una alícuota de 5 μl de una solución de 1 kg/m^3 (1 mg/ml) de compuesto 2 en DMF se añadió a la suspensión de partículas y la mezcla se agitó en un agitador durante una noche. El sobrenadante se eliminó en un bastidor magnético y las partículas se lavaron secuencialmente con varias porciones de metanol seguido de varias porciones de DMF.

Se añadió biotina-NHS éster, 250 μl de una solución de 1 kg/m^3 (1 mg/ml) en DMF, a 12,5 mg de las partículas anteriores en 1 ml de DMF. La mezcla se agitó vorticialmente durante 30 s y se agitó en un agitador durante una noche. El sobrenadante se eliminó y las partículas se lavaron con DMF y después con tampón PBS.

Se añadió estreptavidina, 200 μg en 1 ml de PBS, a las partículas, la mezcla se agitó vorticialmente durante 1 min y después se agitó en un agitador a 37 °C durante 1 h. El sobrenadante se eliminó y las partículas se lavaron con tampón PBS-Tween y después se bloquearon en tampón PBS que contenía BSA al 1 % y sacarosa al 1 % durante 1 hora a 37 °C. Las partículas se lavaron en tampón PBS-Tween seguido de lavado con PBS.

La suspensión de partículas en PBS se hizo reaccionar con 14 μg de anticuerpo TSH de oveja anti-ratón biotinilado a 37 °C durante 1 h. El sobrenadante se eliminó y las partículas se lavaron con tampón PBS-Tween, seguido de lavado con PBS. Las partículas resultantes se suspendieron de nuevo en PBS a una concentración de 20 kg/m^3 (20 mg/ml).

Ejemplo 24. Preparación alternativa de micropartículas de poliestireno modificadas marcadas con acridano. Micropartículas de poliestireno magnéticas funcionalizadas con amina Dynal M-270 se funcionalizaron con compuesto 2 marcador de acridano como en el ejemplo anterior. La biotina se conjugó con las partículas usando los compuestos disponibles en el mercado, denominados biotina-PEG 4-NHS y biotina-PEG 12-NHS.



Todas las etapas posteriores, es decir, la unión de estreptavidina y el anticuerpo TSH de oveja anti-ratón biotinilado, se realizaron como se ha descrito en el ejemplo anterior.

Ejemplo 25. Inmunoensayo Sándwich de TSH usando partículas de poliestireno del Ejemplo 24.

Las partículas del Ejemplo 24, preparadas usando biotina-PEG 12-NHS, se usaron para realizar un inmunoensayo de tipo sándwich para TSH. Se empleó una microplaca de poliestireno de color blanco para contener las partículas y se proporcionó un recipiente de reacción para los inmunoensayos. Los pocillos se bloquearon antes del uso con

bloqueo al 1 % y se lavaron con PBS-T. Una solución madre de 1 kg/m³ (1 mg/ml) de conjugado de cabra anti-TSH-HRP (anticuerpo señal) se diluyó 1:15.000 en bloqueo al 1 %. Una solución madre estándar de TSH que tenía una concentración de 100 µUI/ml se diluyó en serie en diluciones 1:2 con respecto a 0,00076 µUI/ml en FBS. Las partículas se separaron del tampón de almacenamiento y se suspendieron de nuevo en una solución de conjugado de HRP. Las alícuotas de la suspensión de partículas que contenía 0,05 mg de partículas se añadieron a un número suficiente de pocillos para permitir ensayos duplicados sobre el intervalo de concentración deseado, típicamente 12,5 - 0,002 µUI/ml. Se distribuyeron patrones de TSH en el pocillo. Se añadió un blanco que comprendía bloqueo al 1 % o FBS para duplicar los pocillos. La placa se cubrió con un sellador de placas y se incubó con agitación a 37 °C durante 1 hora. Se leyó la luminiscencia inyectando la solución activadora 2 y midiendo la luz durante 2 o 5 segundos de manera secuencial.

Conc. de TSH µUI/ml	Señal-Blanco
12,5	492,3
6,25	291,7
3,13	147,4
1,56	72,07
0,78	32,21
0,39	14,31
0,20	7,04
0,097	3,34
0,048	1,90
0,024	0,655

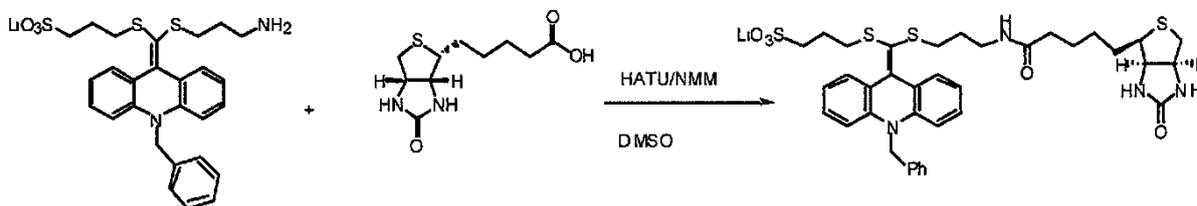
Se obtuvieron resultados casi idénticos en un ensayo usando las partículas del Ejemplo 24, preparadas usando biotina-PEG 4-NHS.

Ejemplo 26. Se prepararon lotes de partículas adicionales del tipo descrito en el Ejemplo 19 de acuerdo con el método sintético descrito, pero con las siguientes variaciones.

1. La magnetita se recubrió con las siguientes relaciones de ortosilicato de tetraetilo con respecto a 3-aminopropiltriethoxisilano: 97,5:2,5, 95:5, 90:10, 80:20 y 60:40 sin recubrimiento adicional de 3-aminopropiltriethoxisilano.
2. La magnetita recubierta, 25 mg, se hizo reaccionar con las siguientes cargas del compuesto 2: 125 µg, 12,5 µg, 5 µg y 2,5 µg.
3. Las partículas preparadas usando 5 y 2,5 µg del compuesto 2 se recubrieron con 0,45 mg, 0,225 mg o 0,1125 mg de anticuerpo TSH anti-ratón.
4. La magnetita recubierta, 25 mg, se hizo reaccionar con 5 µg del compuesto 1b.

Todos los lotes de partículas se usaron satisfactoriamente para realizar un ensayo sándwich de TSH de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

Ejemplo 27. Preparación de un conjugado de biotina-acridano.



Un matraz de fondo redondo de 100 ml se cargó con 430 mg (0,82 mmol) de compuesto de acridano y 250 mg (1 mmol) de biotina, 15 ml de DMSO y 0,45 ml de 4-metil-morfolina (NMM) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 30 min hasta que todos los sólidos se disolvieron. Después, se añadieron en una porción 380 mg de HATU (Aldrich n.º de cat. 44.546-0) y la agitación continuó durante una noche. El DMSO se diluyó con 30 ml de éter causando la separación de un gel. El disolvente se decantó y el gel se lavó con éter varias veces. La mezcla de tipo gel resultante se disolvió en MeOH y se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con MeOH al 10 %/CH₂Cl₂ produciendo 250 mg (32 %). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7,85-7,81(m, 2H), 7,28-6,83(m, 11H), 5,26(s, 2H), 4,4 (m 1H), 4,2 (s, 1H), 3,2-3,0(m, 4H), 2,82-2,76(m, 3H), 2,70-2,55(m, 5H), 2,15(m, 2H), 1,88-1,82(m, 2H), 1,63-1,50(m, 6H), 1,41-1,38(m, 2H) ppm.

Ejemplo 28. Inmunoensayo de microplacas usando estreptavidina y conjugado de biotina-acridano. Se realizó un ensayo de acuerdo con el formato representado en la Figura 8. Se añadió una alícuota de 100 µl de estreptavidina a

15 g/m³ (15 µg/ml) en 1X PBS para cubrir los pocillos de una placa de 96 pocillos de poliestireno de color blanco. La placa se agitó durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador orbital. La solución se eliminó y los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T, eliminando todo el tampón de lavado después de cada etapa.

- 5 Se añadió una alícuota de 200 µl de tampón PBS que contenía BSA al 1 % y sacarosa al 1 % (bloqueo 1X) a los pocillos de una placa de 96 pocillos de poliestireno de color blanco. La placa se mantuvo durante 1 h a 37 °C. La solución se eliminó y los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T, eliminando todo el tampón de lavado después de cada etapa.
- 10 Se añadieron a cada pocillo porciones de una solución de compuesto de biotina-acridano del Ejemplo 27 en 1X bloqueo que contenía 1,5 equivalentes de biotina. La placa se agitó durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador orbital. La solución se eliminó y los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T, eliminando todo el tampón de lavado después de cada etapa.
- 15 El conjugado de TSH de ratón anti-humano conjugado con biotina (2,45 kg/m³ (2,45 mg/ml)) se diluyó 1:20.000 en 1X bloqueo. Las alícuotas, 100 µl, de conjugado diluido se distribuyeron en los pocillos. La placa se agitó durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador orbital. La solución se eliminó y los pocillos se lavaron tres veces con PBS-T, eliminando el tampón de lavado después de cada etapa.
- 20 Se prepararon patrones de TSH que contenían de 12,5 µUI/ml - 0,048 µUI/ml por dilución de 4 veces junto con una solución de 0 µUI/ml en una solución de conjugado anti-TSH-HRP. Los patrones y cero se dispensaron en pocillos logrando un volumen final de 50 µl/pocillo.
- 25 Se diluyó conjugado TSH-HRP de cabra anti-humano (anticuerpo señal) 1:30.000 en bloqueo al 1 %. Se añadió a cada pocillo una alícuota de 50 µl de anticuerpo señal y una dilución de TSH y la placa se incubó durante 1 h a 37 °C.

30 La placa se transfirió a un luminómetro de placa Luminoskan. Sin eliminar la solución de conjugado, se generó luminiscencia inyectando secuencialmente 100 µl de la solución activadora 2 y leyendo la intensidad integrada en cada pocillo durante 5 segundos.

Conc. de TSH µUI/ml	Señal-Blanco
12,5	535,95
3,13	181,65
0,78	69,57
0,20	40,58
0,048	33,60
0,012	31,46
0,0	29,82

35 Ejemplo 29. Experimento de control excluyendo el anticuerpo señal. El protocolo de inmunoensayo del Ejemplo 28 se modificó excluyendo el anticuerpo señal conjugado con HRP.

Conc. de TSH µUI/ml	Señal-Blanco
12,5	0,727
3,13	0,189
0,78	0,079
0,20	0,023
0,048	0,027
0,012	0,023

40 El nivel de quimioluminiscencia detectado estaba esencialmente en el nivel de señal de fondo de ensayo que demuestra la necesidad de tener el conjugado activador unido en proximidad al compuesto quimioluminiscente inmovilizado.

Ejemplo 30. Investigación de composiciones de solución activadora adicionales.

45 La eficacia de diferentes soluciones activadoras se evaluó en un sistema de inmunoensayo modelo. El protocolo del Ejemplo 20 se realizó usando muestras que contenían 6,25 µUI/ml (señal) o 0 µUI/ml (blanco) de TSH.

Potenciador	Concentración	Peróxido	Concentración	S/B
ácido p-hidroxycinnámico	8 mM	Peróxido de urea	5 mm	6,5

ácido p-hidroxicinnámico	80 µm	Peróxido de urea	5 mm	8,1
ácido p-hidroxicinnámico	32 µm	Peróxido de urea	5 mm	9,6
ácido p-hidroxicinnámico	16 µm	Peróxido de urea	5 mm	10,9
ácido p-hidroxicinnámico	11 µm	Peróxido de urea	5 mm	10,2
ácido p-hidroxicinnámico	8 µm	Peróxido de urea	5 mm	9,8

Los datos anteriores ilustran que pueden usarse diversas concentraciones de potenciador en las soluciones activadoras de la presente invención.

5 Ejemplo 31. Investigación de composiciones de solución activadora adicionales.

La eficacia de diferentes soluciones activadoras se evaluó en un sistema de inmunoensayo modelo. El protocolo del Ejemplo 20 se realizó usando muestras que contenían 6,25 µUI/ml (señal) o 0 µUI/ml (blanco) de TSH.

Potenciador	Concentración	Peróxido	Concentración	S/B
ácido p-hidroxicinnámico	8 µm	Peróxido de urea	10 mm	5,3
ácido p-hidroxicinnámico	8 µm	Peróxido de urea	25 mM	5,3
ácido p-hidroxicinnámico	8 µm	Peróxido de urea	37,5 mM	5,0
ácido p-hidroxicinnámico	8 µm	Peróxido de urea	50 mM	5,1
ácido p-hidroxicinnámico	8 µm	Peróxido de urea	100 mM	4,1

10 Los datos anteriores ilustran que pueden usarse diversas concentraciones de peróxido en las soluciones activadoras de la presente invención.

15 Ejemplo 32. Investigación de composiciones de solución activadora adicionales.

La eficacia de diferentes soluciones activadoras se evaluó en un sistema de inmunoensayo modelo. El protocolo del Ejemplo 20 se realizó usando muestras que contenían 6,25 µUI/ml (señal) o 0 µUI/ml (blanco) de TSH.

Potenciador	Concentración	Peróxido	Concentración	S/B
p-fenilfenol	8 µm	Peróxido de urea	1 mM	7,9
p-fenilfenol	8 µm	Peróxido de urea	2,5 mM	6,2
p-fenilfenol	8 µm	Peróxido de urea	5 mm	7,3
p-fenilfenol	100 µm	Peróxido de urea	1 mM	6,0
p-yodofenol	100 µm	Peróxido de urea	2,5 mM	8,4
p-fenilfenol	100 µm	Peróxido de urea	5 mm	10,6

20 Los datos anteriores ilustran que pueden usarse diversas concentraciones de potenciador y peróxido en las soluciones activadoras de la presente invención.

Ejemplo 33. Investigación de composiciones de solución activadora adicionales.

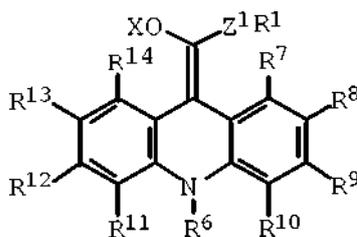
25 La eficacia de diferentes soluciones activadoras se evaluó en un sistema de inmunoensayo modelo. El protocolo del Ejemplo 20 se realizó usando muestras que contenían 6,25 µUI/ml (señal) o 0 µUI/ml (blanco) de TSH.

Potenciador	Concentración	Peróxido	Concentración	S/B
ácido p-hidroxicinnámico	8 µm	Peróxido de urea	5 mm	3,4
d-luciferina	8 µm	Peróxido de urea	5 mm	5,7
6-bromo-2-naftol	8 µm	Peróxido de urea	5 mm	9,6
2-naftol	8 µm	Peróxido de urea	5 mm	7,5
p-yodofenol	8 µm	Peróxido de urea	5 mm	5,3
p-fenilfenol	8 µm	Peróxido de urea	5 mm	8,5

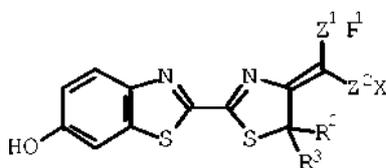
30 Los datos anteriores ilustran que pueden usarse diferentes potenciadores en las soluciones activadoras de la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un kit para realizar un ensayo de unión específica para detectar un analito en una muestra que contiene o se sospecha que contiene, el analito, en donde el kit comprende:
- 10 a) un soporte sólido que tiene inmovilizado en el mismo un compuesto quimioluminiscente y un primer compañero de unión específica para el analito,
- 15 b) un conjugado de un compuesto activador, en donde la unión de al menos uno del analito y el conjugado del compuesto activador, que comprende un compuesto activador conjugado con un segundo compañero de unión específica, al compañero de unión específica inmovilizado en el soporte sólido pone al compuesto activador en proximidad operable con respecto al compuesto quimioluminiscente inmovilizado, y
- 20 c) una solución activadora, en donde la adición de la solución activadora produce quimioluminiscencia a partir de una reacción entre el compuesto quimioluminiscente inmovilizado y el compuesto activador unido para detectar la presencia, localización o cantidad del analito en la muestra,
- en donde el compuesto activador es una enzima peroxidasa, en donde el compuesto quimioluminiscente es un sustrato para una enzima peroxidasa y en donde la solución activadora es una solución acuosa que comprende un compuesto de peróxido.
- 25 2. El kit de la reivindicación 1 en donde el conjugado del compuesto activador comprende
- 30 a) un compuesto activador conjugado con un segundo compañero de unión específica que se une al analito, o
- 35 b) un compuesto activador conjugado con un analito o análogo de analito y en donde la cantidad de quimioluminiscencia es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra.
3. El kit de la reivindicación 1 en donde el primer compañero de unión específica inmovilizado para el analito es un anticuerpo.
4. El kit de la reivindicación 3 que es un inmunoensayo sándwich o un inmunoensayo competitivo.
5. El kit de la reivindicación 1 en donde el primer compañero de unión específica inmovilizado para el analito es una proteína de unión.
- 40 6. El kit de la reivindicación 1 en donde el compuesto quimioluminiscente está
- 45 a) unido covalentemente al soporte sólido,
- b) unido covalentemente a una sustancia auxiliar que se inmoviliza en el soporte sólido,
- 50 c) unido covalentemente a un miembro del par de unión específica que está inmovilizado en el soporte sólido.
7. El kit de la reivindicación 1 en donde el analito es un ácido nucleico diana y en donde el primer compañero de unión específica inmovilizado es un ácido nucleico complementario a una primera región de la diana y en donde el conjugado del compuesto activador es un compuesto activador conjugado con un ácido nucleico que es complementario a una segunda región de la diana.
8. El kit de la reivindicación 1 en donde se emplea un exceso del conjugado del compuesto activador para que una porción del conjugado del compuesto activador permanezca sin unir y en donde el conjugado del compuesto activador no unido no se elimina antes de añadir la solución activadora.
- 55 9. El kit de la reivindicación 1 en donde el primer compañero de unión específica inmovilizado está
- 60 a) unido covalentemente al soporte sólido, o
- b) unido indirectamente al soporte sólido.
10. El kit de la reivindicación 1 en donde el compuesto quimioluminiscente comprende un resto quimioluminiscente y un resto de unión y en donde el resto quimioluminiscente se selecciona de diacilhidrazidas cíclicas aromáticas, MCLA, ácido indolacético, isobutiraldehído, compuestos trihidroxiaromáticos, colorantes de xanteno, ésteres de acridano, tioésteres de acidano, sulfonamidas de acridano, compuestos de acridano cetenoditioacetal, compuestos de acridano de la fórmula:



en donde R^1 se selecciona de grupos alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo y aralquilo de 1-20 átomos de carbono, cualquiera de los cuales 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 glicosilo, 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(alquil C_1-C_8)sililo, un grupo SO_3^- , grupos glicosilo y grupos fosforilo de la fórmula $PO(OR')(OR'')$, en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de grupos alquilo, cianoalquilo, arilo y aralquilo C_1-C_8 , grupos trialquilsililo, cationes de metales alcalinos, cationes de metales alcalinotérreos, cationes de amonio y trialquilsilfosfonio, en donde Z^1 se selecciona de átomos de O y S, en donde R^6 se selecciona de grupos alquilo, fenilo, bencilo, alcoialquilo y carboxialquilo C_1-C_4 sustituidos o no sustituidos, en donde 0 o 1 o 2 de los sustituyentes R^{7-14} se seleccionan de alquilo, alcoxi, hidroxilo y halógeno y el resto de R^{7-14} son hidrógeno y compuestos de la fórmula:



en donde R^1 se selecciona de grupos alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo y aralquilo de 1-20 átomos de carbono, cualquiera de los cuales 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 glicosilo, 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(alquil C_1-C_8)sililo, un grupo SO_3^- , grupos glicosilo y grupos fosforilo 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 trialquilsililo, cationes de metales alcalinos, cationes alcalino-térreos, cationes de amonio y trialquilsilfosfonio, en donde cada uno de Z^1 y Z^2 se selecciona de átomos de O y S y en donde R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C_1-C_8 .

11. El kit de la reivindicación 10 en donde el resto de unión comprende una cadena de alquilenilo de 1-20 átomos que termina en un grupo $-CH_2-$, $-O-$, $-S-$, $-NH-$, $-NR-$, $-SiO-$, $-C(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-C(=O)O-$, $-SC(=O)-$, $-C(=O)S-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=S)-$ o $-C(=O)NR-$, en donde R es alquilo C_1-8 o una cadena de poli(alquilenilo-oxi) de 3-30 átomos que termina en un grupo $-CH_2-$, $-O-$, $-S-$, $-NH-$, $-NR-$, $-SiO-$, $-C(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-C(=O)O-$, $-SC(=O)-$, $-C(=O)S-$, $-NRC(=O)-$, $-NRC(=S)-$ o $-C(O)NR-$, en donde R es alquilo C_1-8 .

12. El kit de la reivindicación 1 en donde el soporte sólido se selecciona de placas de micropocillos, tubos de ensayo, recipientes para muestras, esferas de plástico, tiras reactivas de celulosa, tiras reactivas de papel, tiras reactivas de plástico, partículas de látex, partículas poliméricas, partículas de sílice, coloides metálicos y partículas magnéticas.

13. Un método para detectar un analito en una muestra que contiene o se sospecha que contiene el analito que comprende:

a) proporcionar:

- 1) una muestra,
- 2) un soporte sólido que tiene inmovilizado en el mismo un compuesto quimioluminiscente y un primer compañero de unión específica para el analito, y
- 3) un conjugado de compuesto activador que comprende un compuesto activador conjugado con un segundo compañero de unión específica para el analito;

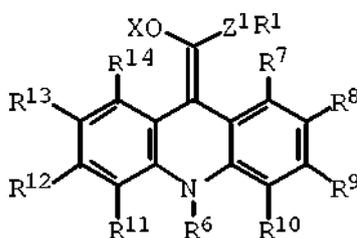
b) poner en contacto el soporte sólido con la muestra y el conjugado de compuesto activador para hacer que el analito en la muestra se una al compañero de unión específica inmovilizado y para

- causar la unión del conjugado de compuesto activador al analito, en donde la unión del analito tanto al compañero de unión específica inmovilizado como al conjugado de compuesto activador pone el compuesto activador en proximidad del compuesto quimioluminiscente inmovilizado;
- 5 c) proporcionar una solución activadora para producir quimioluminiscencia a partir de una reacción entre el compuesto quimioluminiscente inmovilizado y el compuesto activador unido;
- d) detectar la quimioluminiscencia producida; y
- 10 e) relacionar la quimioluminiscencia producida con la presencia, ubicación o cantidad del analito en la muestra, en donde el compuesto activador es una enzima peroxidasa, en donde el compuesto quimioluminiscente es un sustrato para una enzima peroxidasa y en donde la solución activadora es una solución acuosa que comprende un compuesto de peróxido.

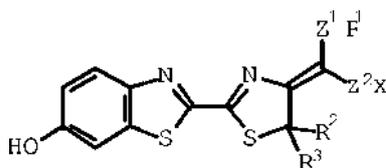
14. Un método para detectar un analito en una muestra que contiene o se sospecha que contiene el analito que comprende:

- 15 a) proporcionar:
- 1) una muestra,
- 2) un soporte sólido que tiene inmovilizado en el mismo un compuesto quimioluminiscente y un primer compañero de unión específica para el analito, y
- 20 3) un conjugado de compuesto activador que comprende un compuesto activador conjugado con un analito o análogo de analito;
- b) poner en contacto el soporte sólido con la muestra y el conjugado de compuesto activador para hacer que tanto el analito en la muestra como el conjugado de compuesto activador se unan competitivamente al compañero de unión específica inmovilizado, en donde la unión del conjugado de compuesto activador al compañero de unión específica inmovilizado pone el compuesto activador en proximidad con respecto al compuesto quimioluminiscente;
- 25 c) proporcionar una solución activadora para producir quimioluminiscencia a partir de una reacción entre el compuesto quimioluminiscente inmovilizado y el compuesto activador unido;
- 30 d) detectar la quimioluminiscencia producida; y
- e) relacionar la quimioluminiscencia producida con la presencia, ubicación o cantidad del analito en la muestra, en donde el compuesto activador es una enzima peroxidasa, en donde el compuesto quimioluminiscente es un sustrato para una enzima peroxidasa y en donde la solución activadora es una solución acuosa que comprende un compuesto de peróxido.

15. Un material que comprende un soporte sólido que tiene inmovilizado en el mismo un compuesto quimioluminiscente que comprende un resto quimioluminiscente y un resto de unión y en donde el resto quimioluminiscente se selecciona de diacilhidrazidas cíclicas aromáticas, MCLA, ácido indolacético, isobutiraldehído, compuestos trihidroxiaromáticos, colorantes de xanteno, ésteres de acridano, tioésteres de acridano, sulfonamidas de acridano, compuestos de acridano cetenoditioacetil, compuestos de acridano de la fórmula:



45 en donde R¹ se selecciona de grupos alquilo, alqueno, alquino, arilo y aralquilo de 1-20 átomos de carbono, cualquiera de los cuales puede estar sustituido con 1-3 grupos seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos tri (alquil C₁-C₈)sililo, un grupo SO³⁻, un grupo OSO₃⁻², grupos glicosilo, un grupo PO₃⁻, un grupo OPO₃⁻, átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, grupos amino, grupos amonio cuaternario o grupos fosfonio cuaternario, en donde X se selecciona de grupos alquilo, arilo, aralquilo C₁-C₈, grupos alquilo o arilo carboxilo que tienen de 1-20 átomos de carbono, grupos M(alquilo C₁-C₈)sililo, un grupo SO₃⁻, grupos glicosilo y grupos fosforilo de la fórmula PO(OR')(OR'') en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de grupos alquilo, cianoalquilo, arilo y aralquilo C₁-C₈, grupos trialkilsililo, cationes de metales alcalinos, cationes alcalinotérreos, cationes de amonio y trialkilfosfonio, en donde Z¹ se selecciona de átomos de O y S, en donde R⁶ se selecciona de grupos alquilo, fenilo, alcoialquilo y carboxialquilo C₁ - C₄ sustituidos o no sustituidos, en donde 0 o 1 o 2 de los sustituyentes R⁷⁻¹⁴ se seleccionan de alquilo, alcoxi, hidroxilo y halógeno y el resto de R⁷⁻¹⁴ son hidrógeno y compuestos de la fórmula:



en donde R¹ se selecciona de grupos alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo y aralquilo de 1-20 átomos de carbono, cualquiera de los cuales puede estar sustituido con 1-3 grupos seleccionados de grupos carbonilo, grupos carboxilo, grupos In (alquil C₁-C₈)sililo, un grupo SO₃⁻, un grupo OSO₃⁻, grupos glicosilo, un grupo PO₃, un grupo OPO₃⁻², átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, grupos amino, grupos de amonio cuaternario o grupos fosfonio cuaternario, en donde X se selecciona de grupos alquilo, arilo, aralquilo C₁-C₈, grupos alquilo o arilo carboxilo que tienen de 1-20 átomos de carbono, grupos In(alquil C₁-C₈)sililo, un grupo SO₃⁻, grupos glicosilo y grupos fosforilo de la fórmula PO(OR')(OR'') en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de grupos alquilo, cianoalquilo, arilo y aralquilo C₁-C₈, grupos trialkilsililo, cationes de metales alcalinos, cationes alcalinotérreos, cationes de amonio y trialkilfosfonio, en donde cada uno de Z¹ y Z² se selecciona de átomos de O y S y en donde R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C₁-C₈, en donde el compuesto quimioluminiscente es un sustrato para una enzima peroxidasa y unido covalentemente a

- a) el soporte sólido, o
- b) una sustancia auxiliar que está inmovilizada en el soporte sólido,

en donde el material comprende además al menos un compañero de unión específica inmovilizado para un analito.

16. El material de la reivindicación 15 en donde el resto quimioluminiscente es un compuestos de acridano ceteneditioacetala.

17. El material de la reivindicación 15 en donde el resto de unión comprende una cadena de alquilenos de 1-20 átomos que termina en un grupo -CH₂-, -O-, -S-, -NH-, -NR-, -SiO-, -C(=O)-, -OC(=O)-, -C(=O)O-, -SC(=O)-, -C(=O)S-, -NRC(=O)- o -C(=O)NR-, en donde R es alquilo C₁-8 o una cadena de poli(alquilenos-oxi) de 3-30 átomos que termina en un grupo -CH₂-, -O-, -S-, -NH-, -NR-, -SiO-, -C(=O)-, -OC(=O)-, -C(=O)O-, -SC(=O)-, -C(=O)S-, -NRC(=O)-, o -C(=O)NR-, en donde R es alquilo C₁-8.

18. El material de la reivindicación 15 en donde la sustancia auxiliar se selecciona de proteínas, péptidos, albúmina sérica, avidina, estreptavidina, anticuerpos, inmunoglobulinas y polímeros sintéticos.

19. El material de la reivindicación 15 que se selecciona de placas de micropocillos, tubos de ensayo, recipientes para muestras, esferas de plástico, tiras reactivas de celulosa, tiras reactivas de papel, tiras reactivas de plástico, partículas de látex, partículas poliméricas, partículas de sílice, coloides metálicos y partículas magnéticas.

20. El material de la reivindicación 15 que se selecciona de placas de micropocillos, tubos de ensayo, recipientes para muestras, esferas de plástico, tiras reactivas de celulosa, tiras reactivas de papel, tiras reactivas de plástico, partículas de látex, partículas poliméricas, partículas de sílice, coloides metálicos y partículas magnéticas y que además comprende al menos un compañero de unión específica inmovilizado para un analito en donde el compañero de unión se selecciona de anticuerpos, proteínas de unión y ácidos nucleicos.

21. Un soporte sólido que tiene inmovilizado en el mismo:

- 1) un compuesto quimioluminiscente, en donde el compuesto quimioluminiscente es un sustrato de peroxidasa que está unido covalentemente al dicho soporte o a una sustancia auxiliar que está inmovilizada en el soporte sólido,
- 2) un compañero de unión específica que tiene afinidad de unión específica para un analito,
- 3) un analito específicamente unido al compañero de unión específica, y
- 4) un conjugado de compuesto activador, que comprende un compuesto activador conjugado con un segundo compañero de unión específica que tiene afinidad de unión específica para el analito, en donde el conjugado de compuesto activador está específicamente unido al analito y en donde el compuesto activador unido está en proximidad operativa con el compuesto quimioluminiscente inmovilizado, además en donde el compuesto activador es una peroxidasa.

22. Un soporte sólido que tiene inmovilizado en el mismo:
- 5 1) un compuesto quimioluminiscente, en donde el compuesto quimioluminiscente es un sustrato de peroxidasa que está unido covalentemente al dicho soporte o a una sustancia auxiliar que está inmovilizada en el soporte sólido,
- 10 2) un compañero de unión específica que tiene afinidad de unión específica para un analito,
- 3) un conjugado análogo de analito-compuesto activador o un conjugado de analito-compuesto activador unidos específicamente al compañero de unión específica, en donde el compuesto activador unido está en proximidad operativa al compuesto quimioluminiscente inmovilizado, además en donde el compuesto activador es una peroxidasa.
23. El soporte sólido de la reivindicación 21 o 22 en donde el soporte sólido se selecciona de placas de micropocillos, tubos de ensayo, recipientes para muestras, esferas de plástico, tiras reactivas de celulosa, tiras reactivas de papel, tiras reactivas de plástico, partículas de látex, partículas poliméricas, partículas de sílice, coloides metálicos y partículas magnéticas, en donde el compuesto quimioluminiscente es un sustrato para una enzima peroxidasa, en donde el compañero de unión se selecciona de anticuerpos, proteínas de unión y ácidos nucleicos, en donde el compuesto activador es una enzima peroxidasa y en donde el compuesto activador unido y el compuesto quimioluminiscente inmovilizado reaccionan para producir quimioluminiscencia en la adición de una solución activadora que comprende un compuesto de peróxido.
- 15
- 20

FIG. 1

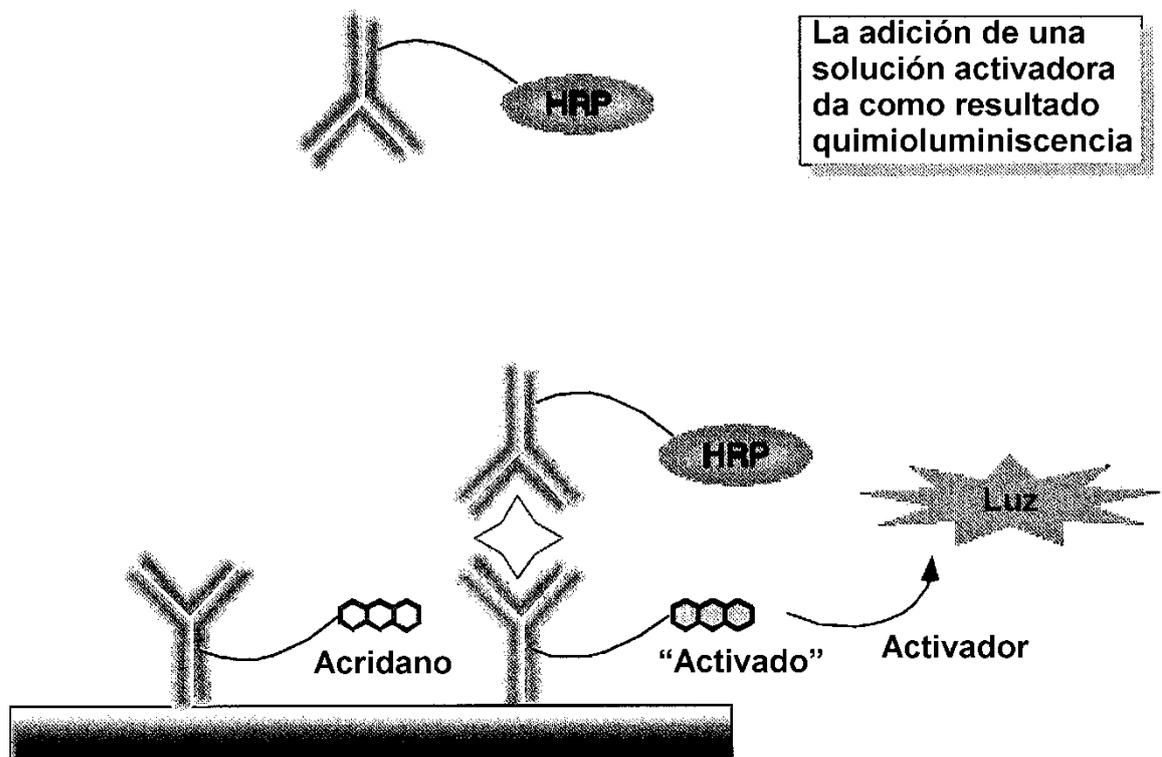


FIG. 2

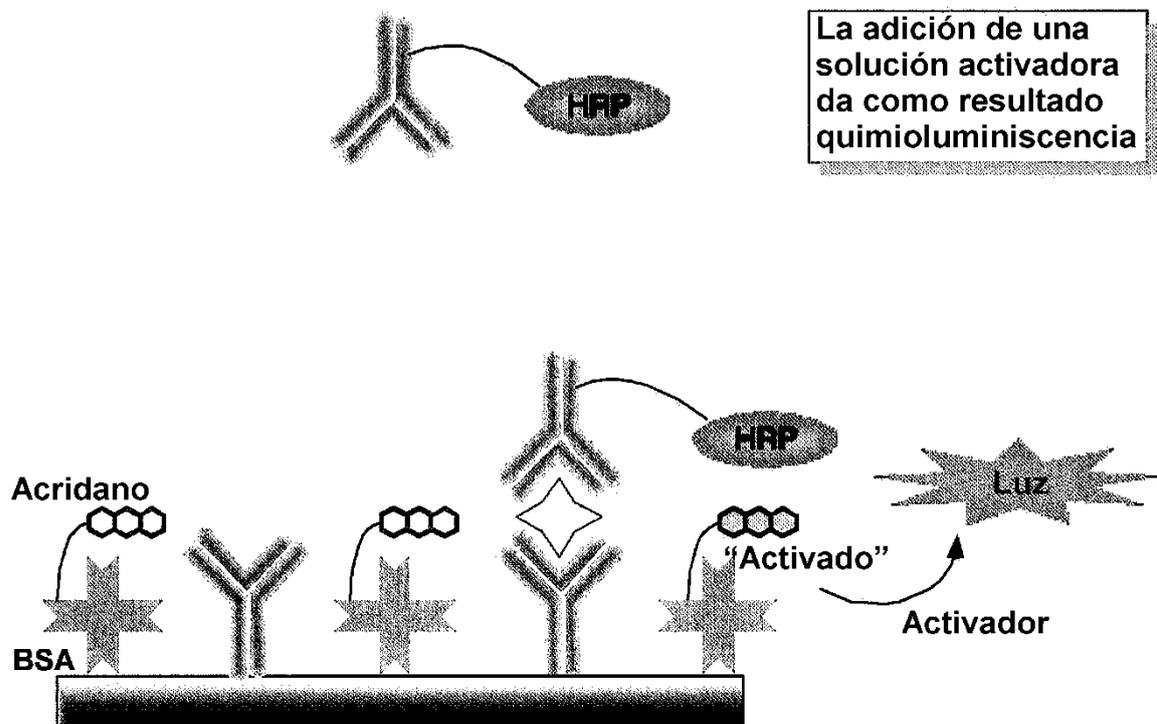


FIG. 3

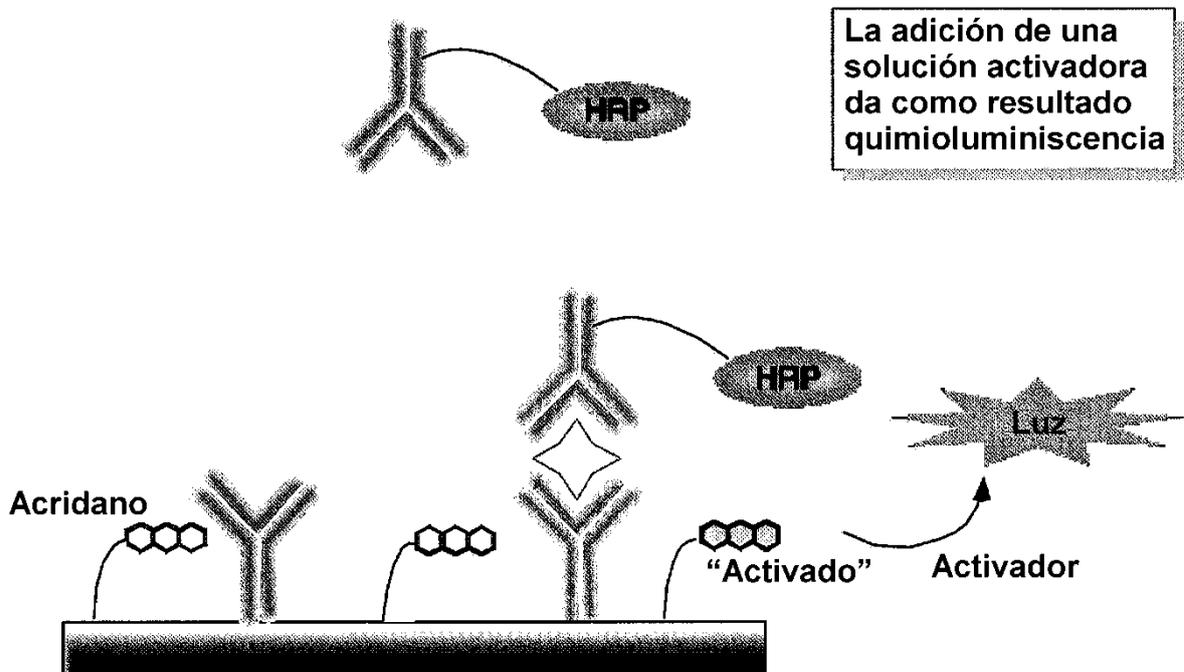


FIG. 4

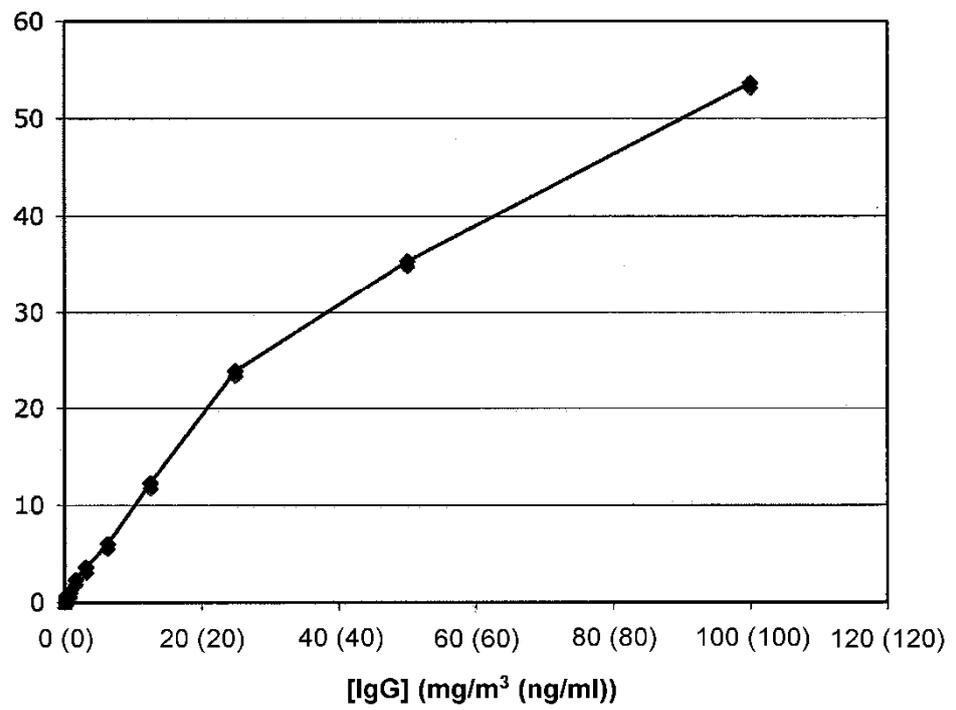


FIG. 5

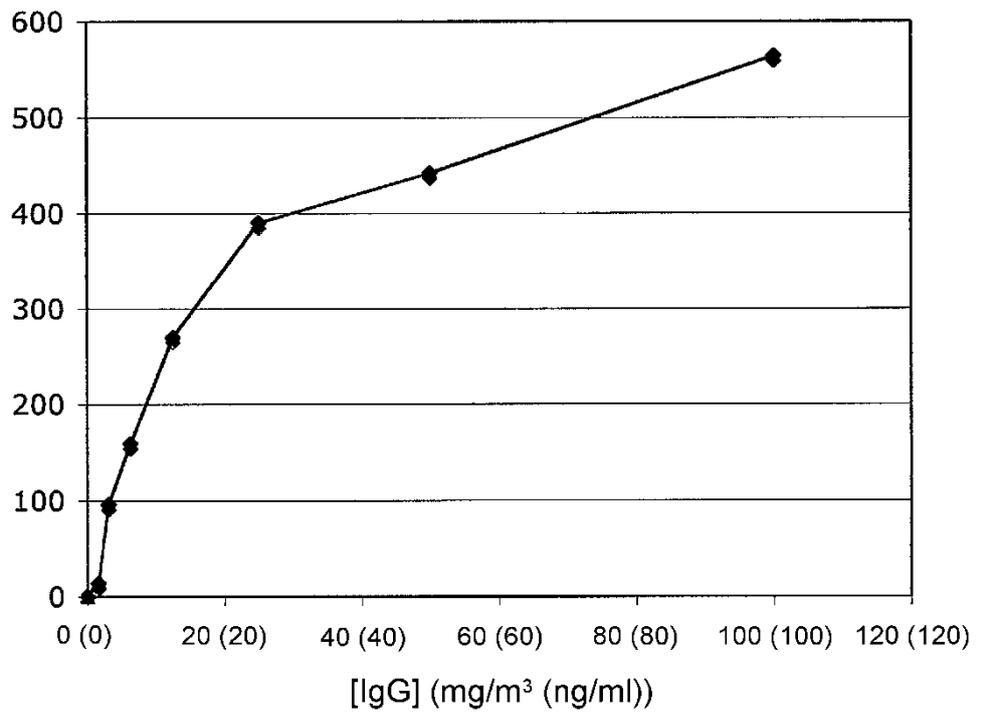


FIG. 6

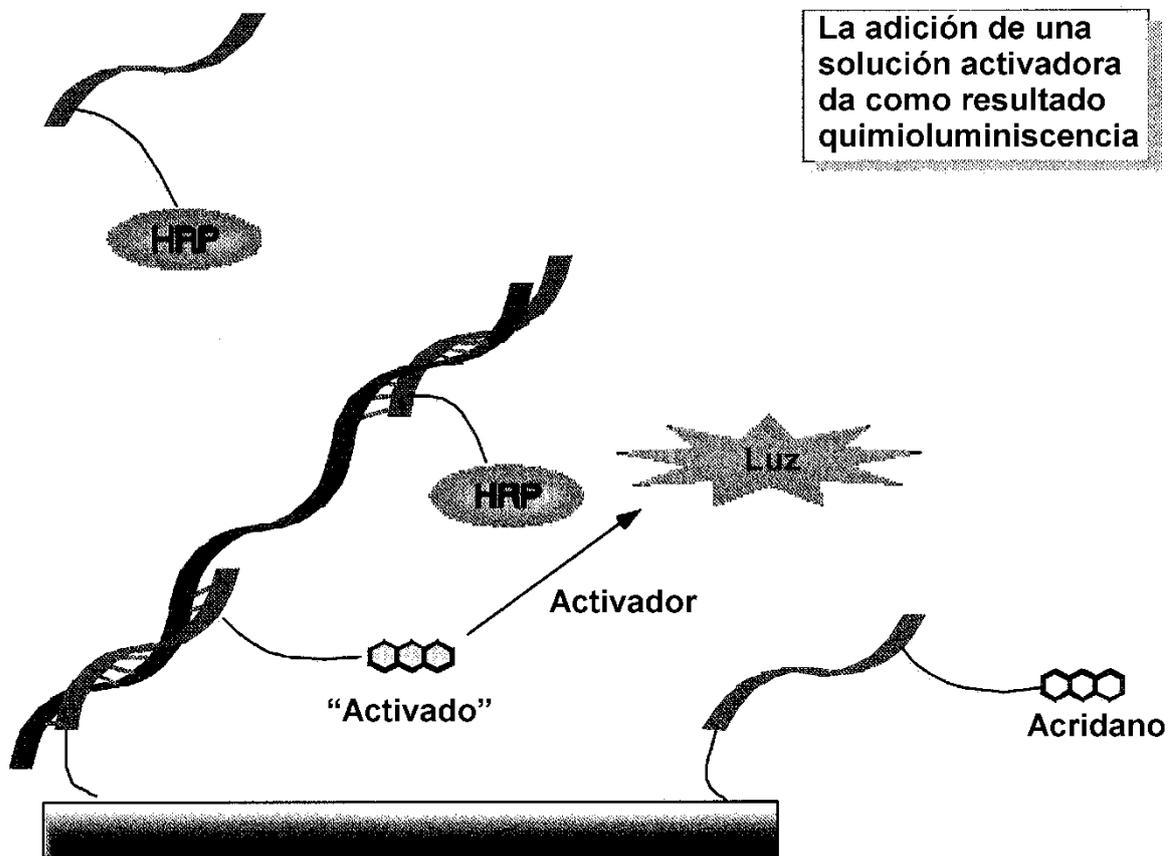


FIG. 7

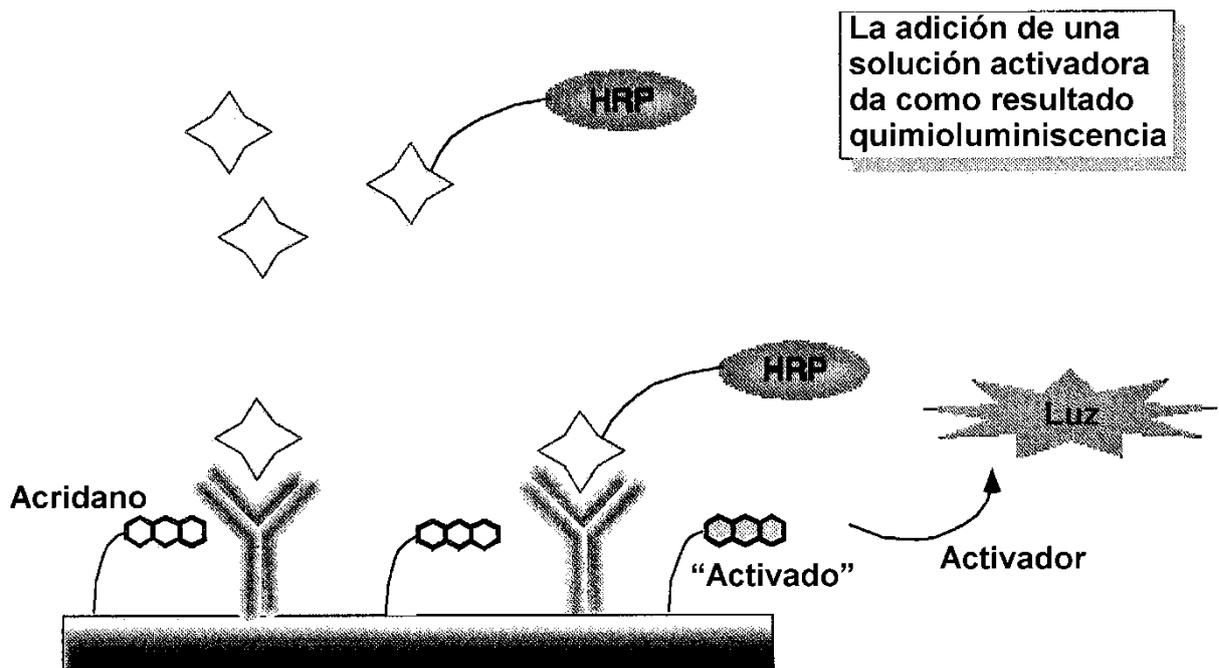


FIG. 8

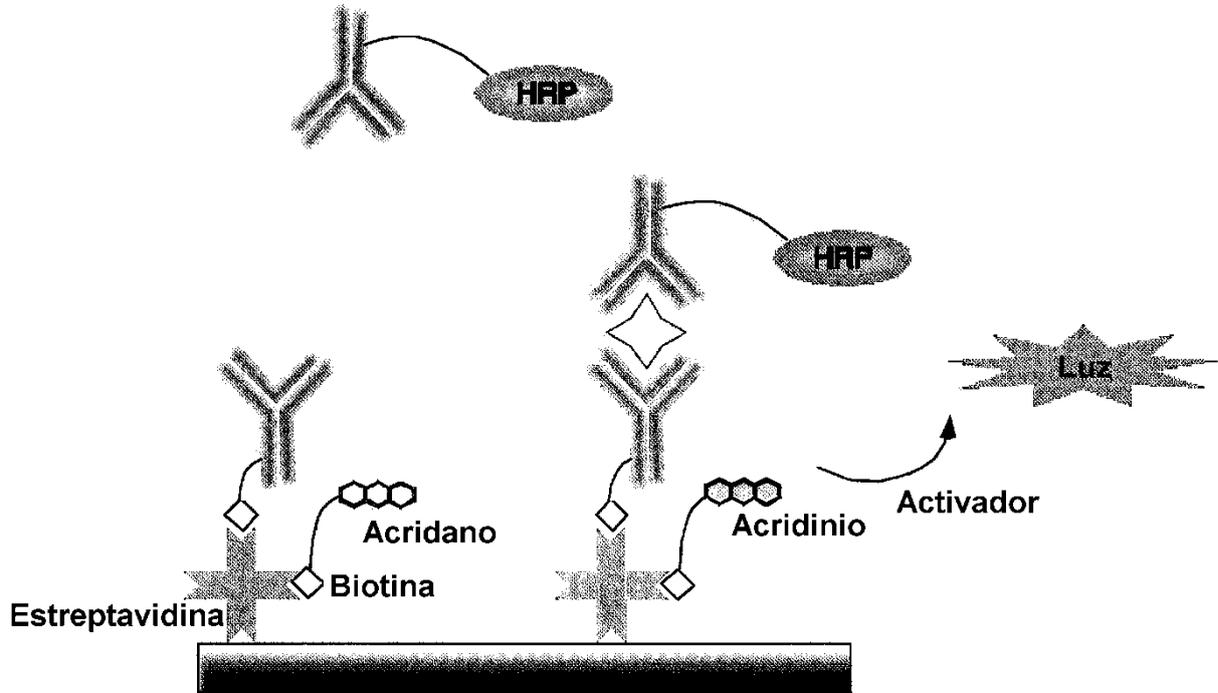


FIG. 9

