

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 740**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2011** **PCT/US2011/048107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012** **WO12024416**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011** **E 11818734 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2606352**

54 Título: **Ensayo de analitos usando múltiples receptores**

30 Prioridad:

20.08.2010 US 860600

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

06.03.2018

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.

(100.0%)

**1717 Deerfield Road
Deerfield, IL 60015, US**

72 Inventor/es:

**LEWISCH, SANDRA, A.;
SCHIAVONI, LYNN, M. y
BEDZYK, WILLIAM, D.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 657 740 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

Ensayo de analitos usando múltiples receptores

Antecedentes

5 La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos útiles para determinar la presencia de analitos.

10 En el campo del diagnóstico clínico se ha visto un gran desarrollo con el transcurso de los años, tanto por la variedad de materiales de interés que se pueden determinar fácilmente y con exactitud, como por los métodos de determinación. Es deseable disponer de medios convenientes, confiables y que no sean peligrosos para detectar la presencia de bajas concentraciones de materiales en líquidos. En la química clínica dichos materiales pueden estar
15 presentes en los fluidos corporales en concentraciones menores de 10^{-12} molar. La dificultad de detectar bajas concentraciones de dichos materiales es mayor debido a los tamaños de muestra relativamente pequeños que se pueden utilizar, así como a la presencia de sustancias que interfieren con la detección del analito por reacción cruzada con los reactivos que se utilizan en la detección de un analito. La respuesta señal-dosis a los cambios en la concentración de analito y la presencia de reactivos con reactividad cruzada en una muestra son consideraciones importantes en el desarrollo de un ensayo.

Existe una continua necesidad de modular la reactividad cruzada y la respuesta señal-dosis en los ensayos de determinación de un analito en una muestra.

Sumario

20 La presente invención se refiere a un método para determinar un analito de moléculas pequeñas en una muestra que se sospecha que contiene el analito y una o más sustancias que interfieren. El método comprende proveer, combinados en un medio: la muestra, y dos o más conjugados de trazador-anticuerpo diferentes. Cada anticuerpo diferente se une a por lo menos dos sitios epitópicos diferentes. Uno de los sitios epitópicos es un sitio de unión en común y uno de los sitios epitópicos no es un sitio de unión en común. Los sitios epitópicos que no son en común son diferentes para cada anticuerpo diferente. Cada uno de los sitios epitópicos que no son en común está presente
25 en una respectiva sustancia que interfiere. El anticuerpo está unido covalentemente al trazador, donde el trazador es un miembro de un sistema que produce una señal, un miembro de un par de unión específico, o un complejo de miembros de un par de unión específico. El medio se incubaba en condiciones que permiten la unión de los diferentes anticuerpos a los sitios epitópicos. El medio se analiza para determinar la presencia y/o la cantidad de complejos que comprenden los sitios epitópicos y los conjugados de trazador-anticuerpo. La presencia y/o la cantidad de los
30 complejos indica la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra. El analito es mono-epitópico con un peso molecular de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 2000. El sitio de unión en común es un sitio epitópico del analito y los sitios de unión que no son en común son sitios epitópicos de las sustancias que interfieren.

35 En el método anterior, cada anticuerpo diferente es parte de un conjugado trazador-anticuerpo diferente. El trazador de cada conjugado trazador-anticuerpo diferente es el mismo y el anticuerpo de cada conjugado trazador-anticuerpo diferente es diferente. En el método anterior, el medio se analiza para determinar la presencia y/o la cantidad de complejos que comprenden los sitios epitópicos y los conjugados de trazador-anticuerpo. La presencia y/o la cantidad de los complejos indica la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.

40 En algunas formas de realización del método anterior, la combinación además comprende un conjugado de análogo del analito-trazador. El medio se analiza para determinar la presencia y/o la cantidad de complejos que comprenden a los receptores y los conjugados de análogo del analito-trazador donde la presencia y/o la cantidad de los complejos indica la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.

45 La presente invención es un método para determinar un analito de moléculas pequeñas en una muestra que se sospecha que contiene dicho analito de moléculas pequeñas y una o más sustancias diferentes que interfieren con la misma. Se provee una combinación que comprende un medio, la muestra, y dos o más conjugados de trazador-anticuerpo diferentes. El trazador de cada conjugado diferente es el mismo y el anticuerpo de cada conjugado diferente es diferente. Cada anticuerpo diferente se une a por lo menos dos sitios epitópicos diferentes donde uno de los sitios epitópicos es un sitio de unión en común y uno de los sitios epitópicos no es un sitio de unión en común. Los sitios epitópicos que no son en común son diferentes para cada anticuerpo diferente y cada uno de los sitios epitópicos que no son en común están presentes en una respectiva sustancia que interfiere. Los conjugados de
50 trazador-anticuerpo exhiben una unión mono-molecular. El medio se incubaba en condiciones que permiten la unión de los diferentes anticuerpos a los sitios epitópicos y se analizan para determinar la presencia y/o la cantidad de complejos que comprenden los sitios epitópicos y los conjugados de trazador-anticuerpo. La presencia y/o la cantidad de los complejos indica la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una curva de calibración de un método de acuerdo con un ejemplo de una forma de realización de la presente invención que muestra la señal del instrumento graficada como una función de la concentración de cortisol.

La Figura 2 es una curva de calibración de la Figura 1, normalizada.

5 Descripción detallada de formas de realización específicas

Según se usa aquí "reactividad cruzada" se refiere a la reacción de una o más sustancias que interfieren que están presentes en una muestra que se sospecha que contiene el analito con uno o más de los reactivos que se emplean en la detección del analito. Una sustancia que interfiere (o reactivo con reactividad cruzada) es cualquier molécula o parte de una molécula, que interfiere en la detección de un analito reaccionando con uno o más de los reactivos que se emplean en la detección del analito. La sustancia que interfiere puede ser mono-epitópica o poli-epitópica. Un "sitio epitópico" o "epitope" es un área en la superficie de una molécula o en una cavidad de la misma, que es reconocida específicamente y que se une a una organización espacial y polar en particular de otra molécula. Una molécula "mono-epitópica" es una molécula que tiene solo un sitio epitópico. Una molécula "poli-epitópica" es una molécula que tiene dos o más sitios epitópicos diferentes, o tres o más sitios epitópicos diferentes, o cuatro o más sitios epitópicos diferentes, o cinco o más sitios epitópicos, por ejemplo.

En algunas formas de realización, las sustancias que interfieren son estructuralmente similares al analito. Las sustancias que interfieren pueden ser metabolitos del analito, análogos del analito, precursores en la síntesis del analito, por ejemplo.

El epitope único de una sustancia mono-epitópica que interfiere puede reaccionar con uno o más de los reactivos que se utilizan en la detección del analito. Por otro lado, un epitope (epitope de no detección) de un analito poli-epitópico puede reaccionar con uno o más de los reactivos que se emplean en la detección del analito donde los uno o más reactivos son específicos para otro epitope (epitope de detección) de un analito poli-epitópico. La presencia del epitope de detección es indicativa de la presencia del analito en una muestra. Dicho de otra manera el epitope de detección es aquel sitio epitópico que es específico para la detección del analito en un ensayo. La sustancia que interfiere también puede ser un fragmento de una molécula de mayor tamaño donde el fragmento comprende un epitope de una molécula poli-epitópica.

Con "respuesta señal-dosis" o "curva estándar" o "dosis respuesta" se hace referencia a una línea curva o sustancialmente lineal dibujada para conectar por lo menos dos puntos de datos de dosificación en la muestra que corresponden a análisis individuales de dosis en la muestra. Las líneas curvas están presentes en los ensayos con curvas no lineales de dosis-respuesta sobre el rango de valores de analito en la muestra mientras que las líneas rectas están presentes en los ensayos con curvas lineales de dosis-respuesta sobre el rango de valores de analito en la muestra. Las señales del instrumento pueden aumentar o disminuir al crecer la concentración del analito, dependiendo de los parámetros del ensayo que se emplean en una determinación en particular.

En los métodos de la presente invención, se combina una muestra que se sospecha que contiene un analito en un medio de ensayo apropiado con dos o más conjugados de trazador-anticuerpo diferentes. El número de anticuerpos diferentes que se emplean depende de uno o más de: la naturaleza del analito, la naturaleza de las sustancias que interfieren, o la naturaleza del anticuerpo incluyendo a las propiedades de unión del anticuerpo para el analito, las propiedades de unión del anticuerpo a las sustancias que interfieren, y la naturaleza de la curva de respuesta señal-dosis, por ejemplo. El número de anticuerpos diferentes puede ser dos, o tres, o cuatro, o cinco o más y puede encontrarse dentro del rango entre 2 y aproximadamente 10, o entre 2 y aproximadamente 8, o entre 2 y aproximadamente 6, o entre 2 y aproximadamente 4, o entre 2 y 3, o entre 3 y aproximadamente 10, o entre 3 y aproximadamente 8, o entre 3 y aproximadamente 6, o entre 3 y 4, o entre 4 y aproximadamente 10, o entre 4 y aproximadamente 8, o entre 4 y aproximadamente 6, o entre 4 y 5, por ejemplo.

El término "conjugado" en el contexto de los "conjugados receptor-trazador" o "conjugados trazador-anticuerpo" se refiere a un receptor o un anticuerpo, respectivamente, que está unido a un trazador ya sea covalentemente o no covalentemente. El trazador de cada conjugado diferente es el mismo y el receptor o anticuerpo de cada conjugado diferente es diferente. El trazador puede ser cualquier molécula relacionada ya sea directa o indirectamente con la generación de una señal en el ensayo que corresponde a la presencia del analito en una muestra. El trazador es parte de un sistema que produce una señal ("sps"), que puede tener uno o más componentes, donde por lo menos un componente es el trazador. El sistema que produce una señal genera una señal que se refiere a la presencia de un analito en una muestra. El sistema que produce una señal incluye a todos los reactivos necesarios para producir una señal medible. Otros componentes del sistema que producen una señal pueden incluir sustratos, intensificadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, secuestrantes, iones de metal, sustancias de unión específicas necesarias para la unión de las sustancias generadoras de una señal, y otras similares. Otros componentes del sistema que produce una señal pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos

enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, y otras similares.

El trazador se puede detectar directamente o se puede detectar indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción de unión específica en la que el trazador se une a una unidad que comprende un componente generador de una señal que produce una señal detectable. El trazador puede ser isotópico o no isotópico, y puede ser, a manera de ilustración y no como limitación, un polinucleótido que codifica un catalizador, un promotor, una tintura, una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, un sensibilizante, que incluye fotosensibilizantes, una enzima, una coenzima, un sustrato de una enzima, un grupo radioactivo, una molécula orgánica pequeña, una secuencia de polinucleótido amplificable, un soporte tal como, por ejemplo, una partícula tal como, por ejemplo, una partícula de látex o de carbono, un sol de metal, una cristalita, un liposoma, una célula, una placa de microtitulación, por ejemplo. En algunas formas de realización el soporte puede estar marcado además o no con una tintura, catalizador u otro grupo detectable, por ejemplo. Los trazadores que son moléculas orgánicas pequeñas son miembros de un par de unión específico ("miembro(s) de un sbp") tal como, por ejemplo, biotina-avidina, digoxina-antidigoxina, digoxigenina-antidigoxigenina, y dinitrofenol-antidinitrofenol.

Un anticuerpo es una molécula con un área en la superficie o en una cavidad, que se une específicamente a una organización espacial y polar en particular de otra molécula y de esa manera se define como complementario de la misma. El anticuerpo puede ser avidina o estreptavidina, un receptor hormonal, una enzima, y proteína A, por ejemplo.

Cada anticuerpo diferente se selecciona por su perfil de unión o perfil de reactividad cruzada con el analito y una o más sustancias que interfieren. La expresión "perfil de unión" o "perfil de reactividad cruzada" se refiere a las propiedades de unión de un anticuerpo con respecto a un analito y a un grupo predeterminado o que se haya seleccionado de sustancias que interfieren. El número de sustancias que interfieren que se incluyen en el grupo predeterminado para determinar un perfil de unión se basa en uno o más de: la naturaleza del analito, la naturaleza de los metabolitos del analito, la naturaleza de la muestra, la naturaleza del anticuerpo, las propiedades de unión del anticuerpo para el analito y las sustancias que interfieren y la naturaleza de los compuestos estructuralmente similares que se sabe o se sospecha que están presentes en una muestra, por ejemplo. Cada uno de los anticuerpos que se seleccione debería exhibir un nivel suficiente de unión con el analito, lo que significa que cada anticuerpo debe tener una afinidad de unión por el analito apropiada para utilizarla en el sistema de ensayo seleccionado para obtener una determinación exacta de la presencia y/o la cantidad de dicho analito. Los anticuerpos con una suficiente afinidad de unión por el analito se pueden seleccionar usando metodologías de selección bien conocidas e incluyen, a manera de ilustración y no como limitación, ELISA, *dot blots*, análisis de Western, y resonancia de plasmón superficial, por ejemplo.

Cada anticuerpo diferente también debe exhibir una baja afinidad de unión con por lo menos una parte de las sustancias que interfieren. La expresión "baja afinidad de unión" se refiere a que el anticuerpo debe tener una afinidad de unión por una sustancia que interfiere no mayor de aproximadamente 80% de la que tiene por el analito, o no mayor que 70% de la que tiene por el analito, o no mayor de aproximadamente 60% de la que tiene por el analito, por ejemplo. La afinidad de unión del anticuerpo por las sustancias que interfieren se puede determinar por técnicas bien conocidas que incluyen, a manera de ilustración y no como limitación, ELISA y resonancia de plasmón superficial, por ejemplo. El número de sustancias que interfieren en la parte por la cual el anticuerpo exhibe una baja afinidad de unión depende de uno o más de: el número total de las sustancias que interfieren que se sospecha que están presentes en una muestra, la naturaleza del analito, la naturaleza de las sustancias que interfieren, la naturaleza de la muestra, la naturaleza del anticuerpo, y las propiedades de unión del anticuerpo para el analito y a las sustancias que interfieren, por ejemplo. La parte de las sustancias que interfieren puede comprender tan poco como un miembro y una cantidad no mayor del número total de sustancias que interfieren menos una. La parte de las sustancias que interfieren puede encontrarse dentro del rango entre aproximadamente 10% y aproximadamente 90%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 80%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 70%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 60%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 50%, o aproximadamente 10 % y aproximadamente 40%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30%, o entre aproximadamente 10% y aproximadamente 20% del número total de sustancias que interfieren.

Además, debería haber una mínima superposición entre una parte de las sustancias que interfieren, que tienen una baja afinidad de unión por un anticuerpo y una parte de las sustancias que interfieren que tienen una baja afinidad de unión por otro anticuerpo. La expresión "mínima superposición" se refiere a que el número de sustancias que interfieren en una parte que tienen una baja afinidad de unión por dos anticuerpos diferentes no debería ser mayor de aproximadamente 10, o aproximadamente 9, o aproximadamente 8, o aproximadamente 7, o aproximadamente 6, o aproximadamente 5, o aproximadamente 4, o aproximadamente 3, o aproximadamente 2, o 1, por ejemplo. El número de anticuerpos diferentes que se empleen debería ser suficiente para que la baja afinidad de unión de la mezcla de anticuerpos sea válida para sustancialmente todas las sustancias que interfieren. Con la expresión "sustancialmente todas las sustancias que interfieren" se hace referencia a que el número de sustancias que interfieren que no están cubiertas por la mezcla de anticuerpos es menor de aproximadamente 10%, o menor de aproximadamente 5%, o menor de aproximadamente 4%, o menor de aproximadamente 3%, o menor de

aproximadamente 2%, o menor de aproximadamente 1 % del número total de sustancias que interfieren.

Como se mencionó antes, cada anticuerpo es diferente y cada anticuerpo diferente se une a por lo menos dos sitios epitópicos diferentes. La diferencia de los anticuerpos es el resultado de que uno de los sitios epitópicos al que se une el anticuerpo es un sitio de unión en común y uno de los sitios epitópicos al que se une el anticuerpo no es un sitio de unión en común. Un sitio de unión en común es un sitio epitópico que es el mismo para todos los anticuerpos que se emplean y cada anticuerpo es capaz de unirse al sitio de unión en común. La expresión "el mismo" se refiere a que el anticuerpo tiene especificidad por el sitio de unión en común pero no se une a las mismas moléculas que comprenden el sitio de unión en común, sino que se une a una molécula que tiene un sitio de unión en común que está libre. Al respecto los anticuerpos exhiben unión mono-molecular, lo que significa que una molécula de anticuerpo se une a solo una molécula que comprende el sitio de unión en común. El sitio de unión en común puede ser un epitope único de un analito mono-epitópico o puede ser un epitope de un analito poli-epitópico.

Los sitios epitópicos que no son en común a los cuales se une cada uno de los anticuerpos diferentes son diferentes para cada anticuerpo diferente. Para analitos mono-epitópicos los sitios epitópicos que no son en común están presentes en las sustancias que interfieren. Para los analitos poli-epitópicos los sitios epitópicos que no son en común puede ser uno o ambos de los sitios epitópicos diferentes del sitio de unión en común en un analito poli-epitópico o sitios epitópicos presentes en las sustancias que interfieren. Como se mencionó antes, los anticuerpos exhiben unión mono-molecular.

El anticuerpo se puede conectar con el trazador covalentemente ya sea directamente mediante un enlace o a través de grupo conector. En algunas formas de realización, la preparación de conjugados de trazador-anticuerpo se puede llevar a cabo empleando grupos funcionales apropiados para unir el trazador al anticuerpo mediante un enlace directo. La naturaleza de los grupos funcionales que se empleen depende de uno o más de: la naturaleza del trazador, la naturaleza del anticuerpo, la naturaleza del analito y la naturaleza de la mezcla de reacción, por ejemplo. Por ejemplo, hay una gran variedad de grupos funcionales apropiados disponibles para unirse un grupo amino y alcoholes; dichos grupos funcionales incluyen, por ejemplo, ésteres activados que incluyen, por ejemplo, ésteres carboxílicos, ésteres imídicos, ésteres sulfónicos y ésteres fosfato; nitritos activados; aldehídos; cetonas; y agentes alquilantes.

El grupo conector puede ser una cadena de entre 1 y aproximadamente 60 o más átomos, o entre 1 y aproximadamente 50 átomos, o entre 1 y aproximadamente 40 átomos, o entre 1 y 30 átomos, o entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 átomos, o entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 átomos, cada uno de los cuales se selecciona independientemente entre el grupo que normalmente consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno, y fósforo, usualmente carbono y oxígeno. El número de heteroátomos en el grupo conector puede encontrarse dentro del rango entre aproximadamente 0 y aproximadamente 8, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6, o entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4. Los átomos del grupo conector pueden estar sustituidos con átomos diferentes de hidrógeno tales como, por ejemplo, uno o más de: carbono, oxígeno y nitrógeno en la forma, por ejemplo, de grupos alquilo, arilo, aralquilo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, o aralcoxi. Como regla general, la longitud de un grupo conector en particular se puede seleccionar arbitrariamente para proveer conveniencia a la síntesis con la salvedad de que el grupo conector debe causar una mínima interferencia con la capacidad de las moléculas conectadas de llevar a cabo su función con relación al ensayo en cuestión.

El grupo conector puede ser alifático o aromático. Cuando hay heteroátomos presentes, el oxígeno normalmente estará presente como oxi u oxo, unido a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo; el azufre estará presente como tioéter o tiono; el nitrógeno normalmente estará presente como nitro, nitroso o amino, normalmente unido a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el fósforo estará unido a carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, usualmente como mono- o diéster fosfonato y fosfato. Las funcionalidades presentes en el grupo conector pueden incluir ésteres, tioésteres, amidas, tioamidas, éteres, ureas, tioureas, guanidinas, grupos azo, tioéteres, carboxilato, etcétera. El grupo conector también puede ser una macromolécula tal como un polisacárido, un péptido, una proteína, un nucleótido, o un dendrímero.

En algunas formas de realización, el anticuerpo y el trazador se pueden conectar entre sí de manera no covalente. Los miembros de un par de unión, usualmente un par de unión específico, se emplean cuando un miembro se conecta al anticuerpo y el otro miembro se conecta al trazador. La unión de los miembros del par de unión da como resultado la unión no covalente del anticuerpo y el trazador. Los miembros del par de unión se pueden conectar directamente a uno o ambos del anticuerpo y el trazador o indirectamente a través de un grupo conector, cuya naturaleza se expuso anteriormente. Un miembro de un par de unión específico es una de dos moléculas diferentes, con un área en la superficie o en una cavidad, que se une específicamente a una organización espacial y polar en particular de la otra molécula y de esa manera se define como complementario de la misma. Los miembros del par de unión específico pueden ser miembros de un par inmunológico tal como: antígeno-anticuerpo o hapteno-anticuerpo, biotina-avidina, hormonas-receptor hormonales, enzima-sustrato, ácidos nucleicos bicatenarios, IgG-proteína A, y pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN, por ejemplo.

Los conjugados de trazador-anticuerpo se pueden preparar conectando cada anticuerpo diferente mediante reacciones separadas, individuales, con el trazador y luego combinando los conjugados de trazador-anticuerpo para formar una mezcla que comprende a los conjugados de trazador-anticuerpo. Como alternativa, los diferentes anticuerpos se pueden combinar y la reacción para conectar los anticuerpos con el trazador se puede llevar a cabo al realizar la combinación.

La cantidad como porcentaje de cada anticuerpo diferente en el medio se selecciona de manera tal de modular la reactividad cruzada y la respuesta señal-dosis en el ensayo. Las cantidades porcentuales de cada anticuerpo diferente no son críticas; sin embargo, en algunas formas de realización se puede preferir un porcentaje más que otro. Las cantidades porcentuales de los anticuerpos se determinan para cada sistema de ensayo individual. Por ejemplo, a manera de ilustración y no como limitación, en un sistema de dos anticuerpos, el rango puede ser de entre 1% y aproximadamente 99 % para el primer anticuerpo donde el resto está formado por el segundo anticuerpo. Para los sistemas en los que se usan tres o más anticuerpos, nuevamente a manera de ilustración y no como limitación, cada anticuerpo puede representar por lo menos 1 %, o por lo menos aproximadamente 2%, o por lo menos aproximadamente 5%, o por lo menos aproximadamente 10%, o por lo menos aproximadamente 15%, o por lo menos aproximadamente 20% del número total de anticuerpos que se utilicen.

La siguiente exposición se refiere a anticuerpos a manera de ilustración y no como limitación; las presentes formas de realización se pueden aplicar a todos los tipos de ensayos en los cuales se emplean uno o más anticuerpos para la determinación de un analito.

Los anticuerpos que se utilizan pueden ser policlonales o monoclonales. La naturaleza del anticuerpo depende de uno o más de: la especificidad del anticuerpo, la afinidad de unión (Kd) del anticuerpo, la cinética de la unión entre el anticuerpo y una molécula complementaria, por ejemplo. El anticuerpo puede incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de los mismos, donde dichas inmunoglobulinas incluyen a las diversas clases e isotipos, como por ejemplo IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3, IgM, etc. Los fragmentos (incluyendo a los fragmentos recombinantes) de los mismos pueden incluir a Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y otros similares. Además, se pueden utilizar agregados, polímeros, y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos.

Los anticuerpos policlonales y los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando técnicas bien conocidas en el arte. Por ejemplo, en un enfoque, se obtienen anticuerpos monoclonales mediante técnicas de hibridación de células somáticas. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir de acuerdo con las técnicas estándar de Köhler y Milstein, Nature 265:495-497, 1975. Se pueden consultar revisiones de técnicas en las que se emplean anticuerpos monoclonales en: *Lymphocyte Hybridomas*, ed. Melchers, y colaboradores Springer-Verlag (Nueva York 1978), Nature 266: 495 (1977), Science 208: 692 (1980), y Methods of Enzymology 73 (Parte B): 3-46 (1981). En general, los anticuerpos monoclonales se pueden purificar mediante técnicas conocidas tales como cromatografía, por ejemplo, cromatografía en DEAE, cromatografía en ABx, y cromatografía HPLC, por ejemplo; filtración, etcétera.

A manera de ilustración y no como limitación, a continuación se describe un ejemplo de un método de selección para seleccionar anticuerpos con un perfil de unión que se desea usando anticuerpos monoclonales como ejemplo. Una muestra que se sospecha que contiene un analito también puede contener diez sustancias que interfieren (IS 1-10) que podrían tener influencia sobre la sensibilidad y la especificidad de un ensayo para la detección del analito por reacción cruzada con el anticuerpo monoclonal. Se obtienen o preparan anticuerpos monoclonales que tienen especificidad por el analito. Los anticuerpos monoclonales se seleccionan empleando un método de ensayo en el que se utiliza cada conjugado trazador-anticuerpo monoclonal diferente en un ensayo para cada uno de los IS 1-10. Para el ensayo que se utiliza se emplea un método de ensayo apropiado y el medio contiene una cantidad del analito que es clínicamente relevante, es decir, una cantidad de analito con la que se pueden tomar decisiones médicamente relevantes. En ausencia de cualquier sustancia que interfiera, este medio se denomina el control. Al medio se le agrega una determinada cantidad de uno de los IS 1-10 (IS 1, por ejemplo) junto con el conjugado trazador-anticuerpo monoclonal. El ensayo se realiza de acuerdo con el protocolo para el ensayo en particular que se seleccione. Se lee una señal y se relaciona con la cantidad de IS 1 en el medio. El porcentaje de reactividad cruzada es 100 veces la concentración aparente del analito debido al reconocimiento del IS ([analito aparente]_{IS presente}) menos la concentración de analito en el control ([analito]_{control}) dividida por la concentración de la sustancia que interfiere [IS]. Por lo tanto, la ecuación es:

$$\frac{100 \times ([\text{analito aparente}]_{\text{IS presente}} - [\text{analito}]_{\text{control}})}{[\text{IS}]}$$

El ensayo se repite para cada una de las sustancias que interfieren IS 1-10. El ensayo se repite también para cada anticuerpo diferente contra cada sustancia que interfiere diferente. Luego se analizan los resultados para seleccionar cada uno de los anticuerpos que se va a emplear en un ensayo para un analito presente en la muestra. La concentración aparente del analito es el valor del analito que se obtiene cuando se analiza una muestra que contiene el analito y el IS mediante un método de prueba que detectará al IS en cierta medida. La misma no es la verdadera

concentración porque el método de prueba que demuestra reactividad cruzada está detectando tanto al analito como al IS.

Por ejemplo, cada uno de los anticuerpos A, B y C exhibe un nivel de unión suficiente al analito y se seleccionan de acuerdo con el método anterior. Se obtiene la siguiente tabla.

5 Tabla 1

Porcentaje de reactividad cruzada

	A	B	C
IS 1	0,2	0,3	13
IS 2	1,5	10	10
IS 3	40	3	2
IS 4	0,1	10	15
IS 5	1,3	5	80
IS 6	5	20	0,3
IS 7	0,01	25	0,02
IS 8	30	5	0,1
IS 9	0,3	0,5	0,3
IS 10	25	10	0,2

10 El anticuerpo monoclonal A exhibe una baja reactividad cruzada con seis de 10 sustancias que interfieren (IS 1, 2, 4, 5, 7 y 9) en comparación con la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal B y el anticuerpo monoclonal C (con la excepción de IS 9) con dichas mismas seis sustancias que interfieren. El anticuerpo monoclonal C exhibe una baja reactividad cruzada con seis de las 10 sustancias que interfieren (IS 3, 6, 7, 8, 9 y 10) en comparación con la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal B y el anticuerpo monoclonal A (con la excepción de IS 7 e IS 9) con dichas mismas seis sustancias que interfieren. Además, el anticuerpo monoclonal A exhibe una alta reactividad cruzada con cuatro sustancias que interfieren (IS 3, 6, 8 y 10) en comparación con la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal B (con la excepción de IS 6) y el anticuerpo monoclonal C con dichas mismas cuatro sustancias que interfieren mientras que el anticuerpo monoclonal C exhibe una alta reactividad cruzada con cuatro sustancias que interfieren (IS 1, 2, 4 y 5) en comparación con la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal B (con la excepción de IS 2) y el anticuerpo monoclonal A a dichas mismas cuatro sustancias que interfieren. Como se puede ver, el anticuerpo monoclonal A exhibe una baja reactividad cruzada con las cuatro sustancias que interfieren, co las cuales el anticuerpo monoclonal C exhibe una alta reactividad cruzada y viceversa. Por lo tanto, se seleccionan los anticuerpos monoclonales A y C para utilizar en un ensayo para el analito en cuestión. Por otro lado, el anticuerpo monoclonal B exhibe un alto nivel de reactividad de unión a ocho de las diez sustancias que interfieren en comparación con la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal A y el anticuerpo monoclonal C a dichas mismas ocho sustancias que interfieren. Por lo tanto, en vista del perfil de los anticuerpos monoclonales A y C, el anticuerpo monoclonal B no se selecciona para incluirlo como un conjugado de trazador-reactivo en un ensayo para el analito donde se espera que IS 1-10 estén presentes en una muestra.

El ensayo de evaluación se puede repetir usando una mezcla de 50% (en peso) de conjugado de anticuerpo monoclonal A-trazador y 50% de conjugado de anticuerpo monoclonal C-trazador. Se obtiene la siguiente tabla:

Tabla 2

Porcentaje de reactividad cruzada

	A	A+C	C
IS 1	0,2	0,3	13
IS 2	1,5	1,7	10
IS 3	40	3	2
IS 4	0,1	0,2	15
IS 5	1,3	3	80

IS 6	5	0,4	0,3
IS 7	0,01	0,02	0,02
IS 8	30	0,5	0,1
IS 9	0,3	0,3	0,3
IS 10	25	1,1	0,2

Como se puede ver, la mezcla de conjugado de anticuerpo monoclonal A-trazador y conjugado de anticuerpo monoclonal C-trazador exhibe un perfil de reactividad cruzada con las diez sustancias que interfieren menor que con cualquiera de los anticuerpos monoclonales individualmente. Además, el perfil de reactividad cruzada demuestra que la reducción de la reactividad cruzada es mayor que la esperada de la mera combinación 50-50 de los dos anticuerpos. Por ejemplo, con respecto a IS 1, la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal A es 0,2 y la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal C es 13; sin embargo, la reactividad cruzada de la combinación 50-50 de los dos anticuerpos es 0,3, que no es un número alrededor del punto medio entre 0,2 y 13.

La muestra a analizar puede ser no biológica o biológica. Las "muestras no biológicas" son aquellas que no están relacionadas con un material biológico e incluyen, por ejemplo, muestras del suelo, muestras de agua, muestras de aire, muestras de otros gases y muestras minerales. La expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico tal como, por ejemplo, fluido corporal, tejido corporal, compuestos corporales y medios de cultivo. La muestra puede ser un sólido, semisólido o un fluido (un líquido o un gas) proveniente de cualquier fuente. En algunas formas de realización, la muestra puede ser excretada por el cuerpo, aspirada del cuerpo, escindida del cuerpo o extraída del cuerpo. El cuerpo es usualmente el de un mamífero, y en algunas formas de realización el cuerpo es un cuerpo humano. Las excreciones del cuerpo son aquellas sustancias excretadas por un cuerpo (aunque también se las puede obtener por escisión o extracción) tales como, por ejemplo, orina, heces, excrementos, moco vaginal, semen, lágrimas, aliento, sudor, fluido de ampollas y exudados inflamatorios. Las escisiones de un cuerpo son aquellos materiales que se escinden de un cuerpo tales como, por ejemplo, piel, pelo y muestras de tejido, incluyendo biopsias de órganos y otras partes del cuerpo. Los aspirados del cuerpo son aquellos materiales que se aspiran de un cuerpo tales como, por ejemplo, moco, saliva y esputo. Las extracciones del cuerpo son aquellos materiales que se extraen de un cuerpo tales como, por ejemplo, sangre entera, plasma, suero, fluido espinal, fluido cerebroespinal, fluido linfático, fluido sinovial y fluido peritoneal.

El analito es una sustancia de interés o el compuesto o composición que se desea detectar y/o cuantificar. El analito puede ser monovalente (mono-epitópico), usualmente hapténico, o polivalente (poli-epitópico) y puede ser un único compuesto o una pluralidad de compuestos que comparten por lo menos un sitio epitópico común o determinante.

Los analitos mono-epitópicos o analitos de moléculas pequeñas tienen un peso molecular de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 2.000, o entre aproximadamente 100 y 2.000, o entre aproximadamente 150 y aproximadamente 2.000, o entre aproximadamente 200 y aproximadamente 2.000, o entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1.500, o entre aproximadamente 200 y aproximadamente 1.000, por ejemplo. Los analitos incluyen hormonas, esteroides, fármacos, metabolitos, plaguicidas, contaminantes, y otras sustancias similares. Los analitos representativos, que se dan a manera de ejemplo y no como limitación, incluyen (i) alcaloides tales como alcaloides derivados de la morfina, que incluyen morfina, codeína, heroína, dextrometorfano, sus derivados y metabolitos; alcaloides derivados de la cocaína, que incluyen cocaína y bencil ecgonina, sus derivados y metabolitos; alcaloides derivados de la ergotamina, que incluyen a la dietilamida del ácido lisérgico; alcaloides esteroides; alcaloides de iminazoilo; alcaloides de quinazolina; alcaloides de isoquinolina; alcaloides de quinolina, que incluyen quinina y quinidina; alcaloides de diterpeno, sus derivados y metabolitos; (ii) esteroides, que incluyen a los estrógenos, andrógenos, esteroides androecorticales, ácidos biliares, glicósidos cardiotónicos y agliconas, que incluyen a: digoxina y digoxigenina, saponinas y sapogeninas, sus derivados y metabolitos; sustancias miméticas de los esteroides, como por ejemplo dietilstilbestrol; (iii) lactamas con entre 5 y 6 miembros del anillo, que incluyen a los barbituratos, por ejemplo, fenobarbital y secobarbital, difenilhidantoína, primidona, etosuximida, y sus metabolitos; (iv) aminoalquilbencenos, con alquilos de entre 2 y 3 átomos de carbono, incluyendo a las anfetaminas; catecolaminas, que incluyen a la efedrina, Ldopa, epinefrina; narceína; papaverina; y metabolitos de los anteriores; (v) benzheterocíclicos que incluyen al oxazepam, clorpromazina, tegretol, sus derivados y metabolitos, donde los anillos heterocíclicos son azepinas, diazepinas y fenotiazinas; (vi) purinas, que incluyen a la teofilina, cafeína, sus metabolitos y derivados; (vii) fármacos derivados de la marihuana, que incluyen al canabinol y al tetrahidrocannabinol; (viii) hormonas tales como la tiroxina, cortisol, triyodotironina, testosterona, estradiol, estrona, progesterona, polipéptidos tales como la angiotensina, LHRH, y inmunosupresores tales como la ciclosporina, FK506, ácido micofenólico (MPA), etcétera; (ix) vitaminas tales como las vitaminas A, B, por ejemplo B12, C, D, E y K, ácido fólico, tiamina; (x) prostaglandinas, que difieren por el grado y los sitios de hidroxilación e insaturación; (xi) antidepresivos tricíclicos, que incluyen a: imipramina, desmetilimipramina, amitriptilina, nortriptilina, protriptilina, trimipramina, clomipramina, doxepina, y desmetildoxepina; (xii) anti-neoplásicos, que incluyen a metotrexato; (xiii) antibióticos, que incluyen a penicilina, cloromicetina, actinomicetina, tetraciclina, terramicina, sus metabolitos y derivados; (xiv) nucleósidos y nucleótidos, que incluyen a ATP, NAD, FMN, adenosina, guanosina, timidina, y citidina con sus

sustituyentes azúcar y fosfato apropiados; (xv) fármacos individuales misceláneos que incluyen a: metadona, meprobamato, serotonina, meperidina, lidocaína, procainamida, acetilprocainamida, propranolol, griseofulvina, ácido valproico, butirofenonas, antihistaminas, cloranfenicol, fármacos anticolinérgicos, como por ejemplo atropina, sus metabolitos y derivados; (xvi) metabolitos relacionados con estados de enfermedad, que incluyen espermina, galactosa, ácido fenilpiruvico, y porfirina de Tipo 1; (xvii) aminoglicósidos, como por ejemplo gentamicina, kanamicina, tobramicina, y amikacina; y (xviii) plaguicidas tales como bifenilos polihalogenados, ésteres fosfato, tiofosfatos, carbamatos, sulfenamidas polihalogenadas, sus metabolitos y derivados.

Generalmente, en algunas formas de realización, el medio de ensayo que provee una sensibilidad óptima al ensayo es un medio en solución acuosa de pH amortiguado con un pH moderado. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir entre 0,1 y aproximadamente 40 por ciento en volumen de un cosolvente tal como, por ejemplo, un solvente orgánico miscible en agua, por ejemplo, un alcohol, un éter o una amida. El pH para el medio usualmente se encontrará dentro del rango de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 11, o dentro del rango entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10, o dentro del rango entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 9,5, por ejemplo. El pH que se utiliza es frecuentemente el resultado de un compromiso entre una óptima unión de los miembros de unión de todos los pares de unión específicos y el pH óptimo de otros reactivos del ensayo tales como los miembros del sistema que producen una señal, por ejemplo. Para obtener el pH que se desea y conservar dicho pH durante la determinación, se pueden utilizar diversos amortiguadores de pH. Los amortiguadores de pH ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, Tris (tris(hidroximetil)-aminometano), barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINE, y otros similares. El amortiguador de pH en particular que se emplee no es crítico, pero en un determinado ensayo puede ser preferible usar uno u otro amortiguador de pH.

En los métodos de ensayo se pueden emplear diversos materiales auxiliares. Por ejemplo, además de los amortiguadores de pH, el medio puede comprender uno o más estabilizantes para el medio y para los reactivos que se emplean y sales para aumentar la fuerza iónica, por ejemplo. En algunas formas de realización, además de dichos aditivos, el medio puede incluir proteínas tales como, por ejemplo, albúminas; solventes orgánicos tales como, por ejemplo, formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como, por ejemplo, sulfato de dextrano; intensificadores de la unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; polisacáridos tales como, por ejemplo, dextrano, trehalosa, u otros similares. El medio también puede comprender agentes para evitar la formación de coágulos de sangre. Dichos agentes son bien conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, a EDTA, EGTA, citrato y heparina. El medio también puede comprender uno o más conservantes tal como se sabe en el arte tales como, por ejemplo, azida de sodio, sulfato de neomicina, PROCLIN® 300 y Estreptomina. Si se emplea, cualquiera de los anteriores materiales está presente en una concentración o una cantidad suficiente para obtener el efecto o la función que se desea.

Luego de preparar la combinación de la muestra y los anticuerpos en el medio, el medio se incuba en condiciones que permiten la unión de los anticuerpos a los sitios epitópicos del analito y de las sustancias que interfieren según sea el caso. Al medio se le pueden ser aplicar uno o más períodos de incubación en uno o más intervalos, incluyendo a cualquier intervalo entre los agregados de diversos reactivos para determinar la presencia y/o la cantidad del analito. En muchas formas de realización, el medio se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que ocurra la unión citada anteriormente y la unión y la reacción entre otros diversos reactivos. Para llevar a cabo el método, normalmente se emplean temperaturas moderadas. Las temperaturas de incubación pueden encontrarse dentro del rango entre aproximadamente 5° y aproximadamente 70 °C, o entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 70 °C, o entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 45 °C, por ejemplo. El período de tiempo para la incubación es de entre aproximadamente 0,2 segundos y aproximadamente 6 horas, o entre aproximadamente 2 segundos y aproximadamente 1 hora, o entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 minutos, por ejemplo. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de la unión de los diversos reactivos, que está determinada por la constante de la velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de la velocidad de disociación.

La concentración de analito con la que se puede realizar el ensayo generalmente varía entre aproximadamente 10^{-5} y aproximadamente 10^{-17} M, más usualmente entre aproximadamente 10^{-6} y aproximadamente 10^{-14} M. Normalmente, las concentraciones de los diversos reactivos estarán determinadas por consideraciones, como por ejemplo sobre si el ensayo es cualitativo, semi-cuantitativo o cuantitativo (con relación a la cantidad de analito presente en la muestra), la técnica de detección en particular y la concentración del analito. Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente estarán determinadas por el rango de concentración del analito de interés. Sin embargo, normalmente la concentración final de cada uno de los reactivos se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo sobre el rango. Es decir, una variación de la concentración de analito que es significativa debería proveer una diferencia de la señal que se puede medir con exactitud. Normalmente, las concentraciones de los diversos reactivos están determinadas por consideraciones tales como la naturaleza del sistema que produce una señal y la naturaleza de los analitos.

Aunque el orden de los agregados puede variar ampliamente, habrá ciertas preferencias, dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden de agregados más simple consiste en agregar todos los materiales simultáneamente

y determinar el efecto que tiene el medio de ensayo sobre la señal como en un ensayo en fase homogénea. Como alternativa, los reactivos se pueden combinar en forma consecutiva. Opcionalmente, después de cada agregado se puede incluir un paso de incubación, como se expuso anteriormente.

5 Se analiza el medio para determinar la presencia y/o la cantidad de complejos que comprenden los anticuerpos donde la presencia y/o la cantidad de los complejos indica la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra, midiendo así la cantidad de analito. Para medir la cantidad de los complejos se puede emplear cualquier método conveniente. La expresión "medir la cantidad de analito" se refiere a la determinación cuantitativa, semi cuantitativa y cualitativa del analito. Se considera que los métodos para medir la cantidad del analito son los métodos que son
10 cuantitativo, semicuantitativo y cualitativo, así como todos los otros métodos de determinación del analito. Por ejemplo, un método que solo detecte la presencia o ausencia del analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito, se considera incluido dentro del alcance de la presente invención. Dentro del alcance de la presente invención se contemplan los términos "detectar" y "determinar", así como otros sinónimos comunes que se refieren a la medición.

15 En muchas formas de realización el examen del medio incluye la detección de una señal proveniente del medio. La presencia y/o la cantidad de la señal están relacionadas con la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra. La modalidad de detección en particular depende de uno o más de: la naturaleza del sistema de ensayo en particular que se emplee y de la naturaleza del o los miembros del sistema que se empleen. Como se expuso anteriormente, existen numerosos métodos por los cuales se puede emplear un trazador, tal como, por ejemplo, el trazador de un conjugado trazador-anticuerpo o de otros reactivos trazadores, para dar como resultado la generación de una señal,
20 que en algunas formas de realización se puede detectar por medios externos. La activación de un sistema que produce una señal depende de la naturaleza de los miembros del sistema que produce la señal. La luminiscencia o la luz que se produce como resultado de la activación del sistema que produce una señal se puede medir a simple vista, fotográficamente, actinométricamente, espectrofotométricamente o por cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad de las mismas, que está relacionada con la cantidad de analito en el medio. El examen de la
25 presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es solo un paso en el cual se lee la señal. La señal normalmente se lee usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, fluorómetro, espectrómetro de absorción, luminómetro, quimioluminómetro, y otros similares.

30 Durante las mediciones, las temperaturas generalmente se encuentran dentro del rango entre aproximadamente 10° y aproximadamente 70°C o entre aproximadamente 20° y aproximadamente 45°C, o entre aproximadamente 20° y aproximadamente 25°C. En algunas formas de realización la temperatura durante la medición es sustancialmente constante. En un enfoque estándar las curvas se forman usando concentraciones conocidas del analito. También se pueden utilizar calibradores y otros controles.

Descripción general de ensayos en los cuales se pueden utilizar los anticuerpos

35 La siguiente exposición se presenta a manera de ilustración y no como limitación. Los anticuerpos de la presente invención se pueden emplear en cualquier ensayo en el que se emplee un reactivo que es un anticuerpo. A manera de ilustración y no como limitación, el uso de conjugados de trazador-anticuerpo encuentra aplicación en particular en los ensayos para analitos de bajo peso molecular o analitos de moléculas pequeñas, pero los conjugados también se pueden utilizar en ensayos para analitos de mayor tamaño. Los ensayos se pueden llevar a cabo ya sea
40 sin separación (en fase homogénea) o con separación (en fase heterogénea) de cualquiera de los componentes del ensayo o productos. Los ensayos en fase heterogénea usualmente incluyen uno o más pasos de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Los ensayos pueden ser manuales o automatizados.

45 En muchas formas de realización, los inmunoensayos incluyen reactivos marcados. Los inmunoensayos que incluyen reactivos marcados incluyen inmunoensayos por quimioluminiscencia, inmunoensayos con enzimas, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radio-inmunoensayos, ensayos de inhibición, ensayos de luminiscencia inducida, y ensayos de fluorescencia de canales de oxígeno, por ejemplo.

50 Un grupo general de inmunoensayos en los cuales se pueden emplear las formas de realización de los conjugados de la presente invención para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra incluyen inmunoensayos usando una concentración limitada de uno de los reactivos del ensayo. Otro grupo de inmunoensayos incluye el uso de un exceso de uno o más de los principales reactivos. Otro grupo de inmunoensayos son los ensayos en fase homogénea libres de separación en los cuales los reactivos marcados modulan la señal del marcador al ocurrir la unión entre los anticuerpos de la presente invención y un analito presente en la muestra.

55 Como se mencionó antes, los ensayos se pueden llevar a cabo ya sea sin separación (en fase homogénea) o con separación (en fase heterogénea) de cualquiera de los componentes del ensayo o productos. Algunos ejemplos de los inmunoensayos en fase homogénea son el ensayo EMIT® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL)

que se divulga en Rubenstein, y colaboradores, Patente de los EE.UU. No. 3.817.837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; el inmunoensayo de luminiscencia inducida ("tecnología LOCI®") que se divulga en la Patente de los EE.UU. No. 5.340.716 (Ullman, y colaboradores); métodos de inmunofluorescencia tales como aquellos que se divulgan en Ullman, y colaboradores, Patente de los EE.UU. No. 3.996.345, columna 17, línea 59, a columna 23, línea 25; inmunoensayos con canales de enzimas ("ECIA") tales como aquellos que se divulgan en Maggio, y colaboradores, Patente de los EE.UU. No. 4.233.402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de la fluorescencia ("FPIA") que se divulga, por ejemplo, entre otros, en la Patente de los EE.UU. No. 5.354.693; inmunoensayos con enzimas tales como el ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas ("ELISA"). Un ensayo en fase heterogénea indicativo es el radioinmunoensayo, que se divulga en Yalow, y colaboradores, J. Clin. Invest. 39:1157 (1960).

Otros inmunoensayos con enzimas son el inmunoensayo mediado por modulador enzimático ("EMMIA") divulgado por Ngo y Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116:285-288; el inmunoensayo de fluorescencia con sustrato marcado ("SLFIA") que fue divulgado por Oellerich, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1984) 22:895-904; los inmunoensayos combinados de enzima donante ("CEDIA") que fueron divulgados por Khanna, y colaboradores, Clin. Chem. Acta (1989) 185:231-240; inmunoensayos homogéneos con partículas marcadas tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétricos mejorados con partículas ("PETINIA"), y inmunoensayo turbidimétrico mejorado con partículas ("PETIA"), etc.; por ejemplo.

Otros ensayos incluyen al inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de tinte dispersa ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos de enzimas unidas a membrana ("EMIA"); luminoinmunoensayos ("LIA"); etcétera. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos con inmunosensores que incluyen el monitoreo de los cambios de las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de un reactivo al ocurrir la unión de un analito. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos con inmunosensores ópticos, ensayos con inmunosensores acústicos, ensayos con inmunosensores semiconductores, ensayos con inmunosensores transductores electroquímicos, ensayos con inmunosensores potenciométricos, y ensayos con electrodos amperométricos.

Los ensayos en fase heterogénea usualmente incluyen uno o más pasos de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. En Davalian, y colaboradores, Patente de los EE.UU. No. 5.089.390, columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9 se divulga una variedad de parámetros de los ensayos en fase heterogénea competitivos y no competitivos. En una forma de realización de un ensayo competitivo en fase homogénea, que se da a manera de ejemplo y no como limitación, los anticuerpos se combinan con un medio que contiene la muestra que se sospecha que contiene el analito y el analito conjugado a una enzima marcadora (análogo del analito) como ejemplo de un trazador. Si está presente el analito, se reduce la cantidad de los anticuerpos que se unen al analito marcado con la enzima, que puede dar como resultado un aumento o una reducción de la señal que se produce, dependiendo de la naturaleza del ensayo. La señal se puede determinar por técnicas convencionales y un aumento o una reducción de la magnitud de la señal se relaciona con la cantidad del analito en la muestra.

En otra forma de realización de un ensayo en fase homogénea competitivo, que se da a manera de ejemplo y no como limitación, se combinan conjugados de trazador-anticuerpo con un medio que contiene la muestra que se sospecha que contiene el analito y el analito conjugado a una enzima marcadora. El trazador de los conjugados de trazador-anticuerpo es un sustrato para la enzima que reacciona con la enzima cuando se pone en estrecha cercanía con la enzima marcadora debido a la unión de los conjugados de trazador-anticuerpo para el analito con la enzima marcadora. Si está presente el analito, se reduce la cantidad de los conjugados de trazador-anticuerpo que se unen al analito marcado con la enzima, que da como resultado una reducción de la señal que se produce. La señal se puede determinar por técnicas convencionales y la reducción de la magnitud de la señal se relaciona con la cantidad del analito en la muestra.

En una forma de realización de un ensayo sándwich no competitivo para la determinación de un analito polipéptico, que se da a manera de ejemplo y no como limitación, se emplean conjugados de trazador-anticuerpo y se forma un sándwich de complejo inmune en un medio de ensayo. El complejo comprende el analito o las sustancias que interfieren, los conjugados de trazador-anticuerpo y un miembro de un sbp que se une al analito o al trazador de los conjugados de trazador-anticuerpo. Luego de eso, se detecta el sándwich de complejo inmune, determinando la presencia del trazador y la cantidad del mismo que está relacionada con la cantidad de analito en la muestra.

Al igual que con el complejo enzima-sustrato de una enzima del ejemplo anterior, en muchos ensayos conocidos se utiliza un sistema que produce una señal en el que se emplean un primero y un segundo miembro de un sps. Los miembros del sps puede estar relacionados porque la activación de un miembro del sps produce un producto tal como, por ejemplo, luz, que da como resultado la activación de otro miembro del sps.

En una forma de realización de un ensayo sándwich heterogéneo, que se da a manera de ilustración y no como limitación, se pone en contacto un miembro de un sbp para el analito unido a un soporte sólido con un medio que contiene una muestra que se sospecha que contiene el analito. Después de un paso de lavado y separación, el soporte se pone en contacto con un medio que contiene, por ejemplo, conjugados de trazador-anticuerpo, donde el

trazador es, por ejemplo, una enzima, durante un segundo período de incubación. El soporte se vuelve a lavar nuevamente y se separa del medio y se analiza ya sea el medio o el soporte para determinar la presencia de una señal. La presencia y/o la magnitud de la señal están relacionadas con la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.

5 En una variación de los anteriores ensayo sándwich, la muestra que se sospecha que contiene el analito en un medio apropiado se pone en contacto con los conjugados de trazador-anticuerpo y se incuba durante un período de tiempo. Luego, el medio se pone en contacto con un miembro de un sbp que comprende un marcador que reacciona con el trazador de los conjugados de trazador-anticuerpo o donde un producto de la activación del marcador o el trazador reacciona con el trazador o el marcador según sea el caso. Después de un período de incubación, el soporte se separa del medio y se lava para eliminar los reactivos no unidos. Se analiza el soporte o el medio para determinar la presencia de una señal, relacionada con la presencia o la cantidad de analito. En otra variación de lo anterior, la muestra, los conjugados de trazador-anticuerpo y el miembro marcado de un sbp se combinan en un medio y se incuban en un único paso de incubación. Se realizan pasos de separación, lavado y examen para determinar la señal como se describió antes. En una forma de realización de la variación que se acaba de divulgar, la señal se determina sin un paso de separación.

En algunas formas de realización de ensayos conocidos, los miembros de un sps comprenden un sensibilizante tal como, por ejemplo, un fotosensibilizante, y una composición quimioluminiscente donde la activación del sensibilizante da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. Un miembro del sps usualmente genera una señal detectable que se refiere a la cantidad del miembro del sps unido y/o no unido, es decir la cantidad de miembro del sps unido o no unido al analito que se detecta o a un agente que refleja la cantidad del analito que se desea detectar. De acuerdo con algunas formas de realización de la presente invención, el trazador que se emplea, por ejemplo, en los conjugados de trazador-anticuerpo, puede ser uno de: ya sea el sensibilizante reactivo o el reactivo quimioluminiscente o puede ser un miembro de un sbp que se une a un miembro complementario de un sbp que comprende ya sea el sensibilizante o el reactivo quimioluminiscente. Una forma de realización de un ensayo con dichas características es el inmunoensayo de luminiscencia inducida (LOCI). Como se indicó anteriormente, el inmunoensayo de luminiscencia inducida se describe en la Patente de los EE.UU. No. 5.340.716 (Ullman).

Un compuesto quimioluminiscente es un compuesto que se activa químicamente y, como resultado de dicha activación, emite luz a ciertas longitudes de onda. Algunos ejemplos de compuestos quimioluminiscentes, a manera de ilustración y no como limitación, incluyen olefinas capaces de reaccionar con oxígeno singlete o un peróxido para formar hidroperóxidos o dioxetanos, que se pueden descomponer para dar cetonas o derivados ácidos carboxílicos; dioxetanos estables que se pueden descomponer por acción de la luz; acetilenos que pueden reaccionar con oxígeno singlete para formar dicetonas; hidrazonas o hidrazidas que pueden formar compuestos azo o azo carbonilos tales como el luminol; y compuestos aromáticos que pueden formar endoperóxidos, por ejemplo. Como consecuencia de la reacción de activación, los compuestos quimioluminiscentes causan directa o indirectamente la emisión de luz.

Un sensibilizante es una molécula, usualmente un compuesto, que genera un intermediario reactivo tal como, por ejemplo, oxígeno singlete, para activar un compuesto quimioluminiscente. En algunas formas de realización, el sensibilizante es un fotosensibilizante. Otros sensibilizantes que pueden ser activados químicamente (por ejemplo, por enzimas y sales de metales) incluyen, a manera de ejemplo y no como limitación, a otras sustancias y composiciones que pueden producir oxígeno singlete con o, menos preferiblemente, sin activación por una fuente de luz externa. Por ejemplo, se ha mostrado que ciertos compuestos catalizan la conversión de peróxido de hidrógeno a oxígeno singlete y agua. Dentro del alcance de los fotosensibilizantes también se incluyen los compuestos que no son verdaderos sensibilizantes pero que al ser excitados por el calor, la luz, la radiación ionizante, o por una activación química liberarán una molécula de oxígeno singlete. Los miembros de esta clase de compuestos incluyen, por ejemplo, a los endoperóxidos tales como endoperóxido de 1,4-biscarboxietil-1,4-naftaleno, 9,10-difenilantraceno-9,10-endoperóxido y 5,6,11,12-tetrafenil naftaleno 5,12-endoperóxido. El calentamiento o la absorción directa de luz por dichos compuestos libera oxígeno singlete.

Un fotosensibilizante es un sensibilizante para la activación de un compuesto fotoactivo, por ejemplo, por generación de oxígeno singlete por excitación con luz. Los fotosensibilizantes se activan con la luz e incluyen, por ejemplo, tinturas y compuestos aromáticos, y usualmente son compuestos que comprenden átomos unidos covalentemente, usualmente con múltiples enlaces dobles o triples conjugados. Los compuestos deben absorber luz en el rango de longitudes de onda entre 200 y 1.100 nm, o entre 300 y 1.000 nm, o entre 450 y 950 nm, con un coeficiente de extinción en su máximo de absorbancia mayor que $500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o mayor que $5.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o mayor que $50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, en la longitud de onda de excitación. Los fotosensibilizantes deberían ser relativamente fotoestables y, preferiblemente, no reaccionan eficientemente con el oxígeno singlete. Algunos ejemplos de fotosensibilizantes, a manera de ilustración y no como limitación, incluyen acetona, benzofenona, 9-tioxantona, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metalo-porfirinas, como por ejemplo hematoporfirina, ftalocianinas, clorofilas, rosa de bengala, y buckminsterfullereno, por ejemplo, y derivados de dichos compuestos.

Algunos ejemplos de compuestos quimioluminiscentes y fotosensibilizantes que se pueden utilizar en las formas de realización de los ensayos que emplean los conjugados con trazadores de la presente se dan en la Patente de los EE.UU. No. 5.340.716 (Ullman, y colaboradores).

En algunos ensayos en los cuales se pueden emplear los anticuerpos de la presente invención se utiliza un soporte con el cual se pueden asociar uno o más reactivos tales como el trazador o un anticuerpo o un conjugado trazador-anticuerpo. El soporte puede ser sólido o semi-sólido y puede comprender un material orgánico o inorgánico, insoluble en agua, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte sólido tiene una superficie que es hidrofóbica y puede tener cualquiera de varias formas tales como, por ejemplo, puede ser un particulado, incluyendo a las perlas y partículas, una película, membrana, tubo, pocillo, tira, varilla, y superficies planas tales como, por ejemplo, en forma de placas. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte sólido se puede suspender o no en el medio en el que se emplea. Algunos ejemplos de un soporte sólido que puede formar una suspensión incluyen materiales poliméricos tales como partículas de látex y partículas magnéticas. Otras composiciones de soporte sólido incluyen polímeros, como por ejemplo poli (cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli-(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato etileno), nailon, y poli(butirato de vinilo), por ejemplo; que se utilizan ya sea como tales o en conjunto con otros materiales.

En algunas formas de realización el soporte es una partícula. Las partículas generalmente tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 100 micrones, o entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 100 micrones, o entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 100 micrones, o entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 100 micrones, o entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 50 micrones, o entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 50 micrones, o entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 micrones, o entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 50 micrones, o entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 20 micrones, o entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 20 micrones, o entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20 micrones, por ejemplo. En algunas formas de realización, las partículas tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 0,05 micrones y aproximadamente 20 micrones o entre aproximadamente 0,3 micrones y aproximadamente 10 micrones, o entre aproximadamente 0,3 micrones y aproximadamente 5 micrones, por ejemplo. En algunas formas de realización, las partículas son partículas de látex o partículas de cromo.

Una partícula de látex es un particulado que puede formar una suspensión en agua, de un material polimérico insoluble en agua. En algunas formas de realización el látex es un polietileno sustituido tal como poliestireno-butadieno, poli(acrilamida) poliestireno, poliestireno con grupos amino, poli(acrílico), ácido polimetacrílico, acrilonitrilo-butadieno, copolímeros de estireno, acetato acrilato de polivinilo, polivinil piridina, copolímeros de cloruro de vinilo y acrilato, y otros similares.

Las partículas poliméricas se pueden formar con polímeros de adición o condensación. Las partículas se dispersarán fácilmente en un medio acuoso y se pueden funcionalizar de manera que permiten la conjugación a uno o más de un miembro del sps y un miembro de un sbp, por ejemplo. Las partículas también pueden derivar de materiales de origen natural, materiales de origen natural modificados sintéticamente, y materiales sintéticos. En algunas formas de realización las partículas tienen una funcionalidad reactiva ya sea de origen natural o introducida sintéticamente, tal como, por ejemplo, grupos amina, que son reactivos con una funcionalidad reactiva correspondiente tal como, por ejemplo, grupos aldehído. Como se mencionó antes, el trazador u otro ensayo reactivo se puede asociar con el soporte. La manera en que ocurre la asociación del trazador o el reactivo con un soporte depende de uno o más de: la naturaleza del soporte, la naturaleza del reactivo, el área superficial y la porosidad del soporte y la naturaleza de cualquier solvente que se emplee, por ejemplo. La asociación puede ocurrir por adsorción del reactivo por el soporte, unión covalente del reactivo al soporte, disolución o dispersión del reactivo en el soporte sólido, unión no covalente del reactivo al soporte por medio de miembros del par de unión (por ejemplo, avidina-biotina y digoxina-anticuerpo para digoxina), por ejemplo. De esta manera, el reactivo está "asociado con" el soporte sólido.

La asociación de un reactivo tal como, por ejemplo, un sensibilizante o un compuesto quimioluminiscente, con partículas de látex puede incluir la incorporación durante la formación de las partículas por polimerización, o la incorporación a partículas preformadas, por ejemplo, por disolución no covalente en las partículas, por ejemplo. En algunos enfoques se emplea una solución del reactivo. Los solventes que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, alcoholes, que incluyen, por ejemplo, etanol, etoxietanol, metoxietanol, etilenglicol y alcohol bencílico, amidas tales como, por ejemplo, dimetil formamida, formamida, acetamida y tetrametil urea; sulfóxidos tales como, por ejemplo, dimetil sulfóxido y sulfolano; y éteres tales como, por ejemplo, carbitol, etil carbitol y dimetoxi etano; y agua; y mezclas de dos o más de los anteriores. El uso de solventes con altos puntos de ebullición en los cuales las partículas son insoluble permite usar temperaturas elevadas para facilitar la disolución de los compuestos en las partículas y es particularmente apropiado. Los solventes se pueden utilizar solos o como una combinación. Se debería seleccionar un solvente que no interfiera con la capacidad de producir una señal del reactivo debido a sus propiedades o su capacidad intrínseca de ser eliminada de las partículas. En algunas formas de realización se pueden emplear solventes aromáticos tales como, por ejemplo, ftalato de dibutilo, benzonitrilo, naftonitrilo, tereftalato de dioctilo, diclorobenceno, difeniléter y dimetoxibenceno.

Generalmente, la temperatura que se emplea durante el procedimiento se selecciona de manera de maximizar la magnitud de la señal que se recibe de las partículas del miembro del sps con la salvedad de que las partículas no se deben fundir o ni formar agregados a la temperatura seleccionada. En algunas formas de realización, se emplean temperaturas elevadas. Las temperaturas para el procedimiento pueden encontrarse dentro del rango entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 200°C, o entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 170°C, por ejemplo. Se ha observado que algunos compuestos que son casi insolubles a la temperatura ambiente son solubles, por ejemplo, en alcoholes de bajo peso molecular, como por ejemplo etanol y etilenglicol, por ejemplo, a temperaturas elevadas. Se ha mostrado que las partículas de látex modificadas por carboxilación toleran a los alcoholes de bajo peso molecular a dichas temperaturas.

En un ejemplo de un inmunoensayo competitivo de luminiscencia inducida que se da a manera de ejemplo y no como limitación, el ensayo utiliza una partícula asociada con un fotosensibilizante y un primer miembro de un sbp, por ejemplo, un compañero de unión de la biotina tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina. El reactivo quimioluminiscente comprende un análogo del analito. Un tercer reactivo comprende conjugados de trazador-anticuerpo donde el trazador es un segundo miembro de un sbp que es complementario del primer miembro de un sbp tal como, por ejemplo, biotina. El reactivo quimioluminiscente que comprende el análogo del analito compete con el analito en una muestra por la unión a los conjugados de trazador-anticuerpo. Por lo tanto, cuanto más analito haya en la muestra, mayor será la reducción de la señal que se produce debido al acercamiento del fotosensibilizante y el compuesto quimioluminiscente debido a la unión de los conjugados de trazador-anticuerpo al reactivo quimioluminiscente que comprende el análogo del analito. El fotosensibilizante genera oxígeno singlete y activa el reactivo quimioluminiscente cuando los dos marcadores se acercan mucho. Luego de eso el reactivo quimioluminiscente activado produce luz. La cantidad de luz que se produce está relacionada inversamente con la cantidad del complejo que se forma entre el analito y el reactivo fotosensibilizante y el reactivo quimioluminiscente, que a su vez se relaciona con la cantidad presente de analito.

En otro ejemplo de un inmunoensayo de luminiscencia inducida que se da a manera de ejemplo y no como limitación, el ensayo utiliza una partícula asociada con un fotosensibilizante y un primer miembro de un sbp, por ejemplo, un compañero de unión para el analito. El reactivo quimioluminiscente comprende un segundo miembro de un sbp. De acuerdo con las formas de realización de la presente invención, ya sea el reactivo fotosensibilizante o el reactivo quimioluminiscente pueden ser, por ejemplo, conjugados de trazador-anticuerpo donde el trazador es ya sea el fotosensibilizante o el compuesto quimioluminiscente. Los miembros de un sbp se unen al analito para formar un complejo, o el primer miembro de un sbp se une al segundo miembro de un sbp para formar un complejo, con relación a la presencia del analito en el medio. Si el analito está presente, el fotosensibilizante y el compuesto quimioluminiscente se acercan mucho debido a la unión en base a la presencia del analito. El fotosensibilizante genera oxígeno singlete y activa el reactivo quimioluminiscente cuando los dos marcadores se acercan mucho. Luego de eso, el reactivo quimioluminiscente activado produce luz. La cantidad de luz que se produce se relaciona con la cantidad del complejo que se forma, lo que a su vez se relaciona con la cantidad de analito que haya presente.

En algunas formas de realización del ensayo de luminiscencia inducida que se da a manera de ilustración y no como limitación, se emplea una partícula fotosensibilizante que está conjugada con avidina o estreptavidina. También se emplea un miembro biotinilado de un sbp que se une al analito. En esta forma de realización indicativa también se emplea un reactivo quimioluminiscente, que comprende un miembro de un sbp que se une al analito. De acuerdo con las formas de realización de la presente invención ya sea el miembro biotinilado de un sbp o el reactivo quimioluminiscente se puede representar por los conjugados de trazador-anticuerpo. El medio de reacción se incubaba para permitir que las partículas fotosensibilizantes se unan al miembro biotinilado de un sbp debido a la unión entre la avidina y la biotina y también permite que el compañero de unión para el analito se una al analito. Luego, el medio se irradia con luz para excitar al fotosensibilizante, que en su estado excitado es capaz de activar al oxígeno a un estado singlete. Como el reactivo quimioluminiscente ahora está muy cerca del fotosensibilizante debido a la presencia del analito, es activado por el oxígeno singlete y emite luminiscencia. Luego, se analiza el medio para determinar la presencia y/o la magnitud de la luminiscencia o la luz emitida, donde su presencia está relacionada con la presencia y/o la cantidad del analito.

En algunas formas de realización del ensayo de luminiscencia inducida para un analito poli-epitópico que se da a manera de ilustración y no como limitación, se emplea una partícula fotosensibilizante que está conjugada a la avidina o la estreptavidina. También se emplea un miembro biotinilado de un sbp que se une al analito. En esta forma de realización indicativa también se emplea un reactivo quimioluminiscente, que comprende un análogo del analito. De acuerdo con las formas de realización de la presente invención ya sea el miembro biotinilado de un sbp o el reactivo quimioluminiscente se puede representar, por ejemplo, por los conjugados de trazador-anticuerpo. El medio de reacción se incubaba para permitir que las partículas fotosensibilizantes se unan al miembro biotinilado de un sbp debido a la unión entre la avidina y la biotina y también permite que el compañero de unión para el analito se una al analito o al análogo del analito. Luego, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizante, que en su estado excitado es capaz de activar al oxígeno a un estado singlete. La presencia del analito da como resultado que una menor cantidad de reactivo quimioluminiscente se acerca mucho al fotosensibilizante y, por lo tanto, la magnitud

de la reducción de la señal (luminiscencia) como resultado de la activación del reactivo quimioluminiscente por el oxígeno singlete. Luego se analiza el medio para determinar la presencia y/o la magnitud de la luminiscencia o la emisión de luz, donde la reducción de la cantidad de los mismos está relacionada con la presencia y/o la cantidad del analito poliepitópico.

- 5 Como se mencionó antes, la muestra y los reactivos se proveen al medio en forma de combinación. Aunque el orden de los agregados al medio puede variar, en algunas formas de realización habrá ciertas preferencias por los parámetros del ensayo que se describen aquí. Por supuesto, el orden de agregados más simple, consiste en agregar todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que tiene el medio de ensayo sobre la señal, como en un ensayo en fase homogénea. Como alternativa, cada uno de los reactivos, o grupos de reactivos, se puede
- 10 combinar en forma consecutiva. En algunas formas de realización, se puede incluir un paso de incubación después de cada agregado según se expuso anteriormente. En los ensayos en fase heterogénea, también se pueden emplear pasos de lavado después de uno o más pasos de incubación.

Kits que comprenden reactivos para realizar ensayos

- 15 Las formas de realización de la presente invención de los anticuerpos y los conjugados de trazador-anticuerpo y otros reactivos para realizar un ensayo en particular para un analito pueden estar presentes en un conjunto de elementos útiles para llevar a cabo convenientemente un ensayo para la determinación de un analito. En algunas formas de realización un conjunto de elementos comprende una combinación envasada de dos o más anticuerpos o conjugados de trazador-anticuerpo. El kit también puede incluir miembros de un sistema que produce una señal diferente del trazador. En algunas formas de realización el trazador es una molécula pequeña tal como, por ejemplo, biotina, y los miembros del sistema que produce una señal incluyen un compañero de unión para las moléculas pequeñas, tal como, por ejemplo, avidina, estreptavidina o un anticuerpo específico para la biotina donde el
- 20 compañero de unión está unido a un marcador. Por ejemplo, cuando el sistema que produce una señal incluye un fotosensibilizante y un compuesto quimioluminiscente, el compañero de unión para la biotina se puede conectar al fotosensibilizante o al compuesto quimioluminiscente. El conjunto de elementos puede incluir además otros reactivos para llevar a cabo el ensayo, cuya naturaleza depende de los parámetros particulares del ensayo.
- 25

Cada uno de los reactivos puede encontrarse en recipientes separados o se pueden combinar diversos reactivos en uno o más recipientes, dependiendo de la reactividad cruzada y estabilidad de los reactivos. El conjunto de elementos además puede incluir otros reactivos envasados por separado para realizar un ensayo tal como miembros adicionales de un sbp, miembros de un sps y reactivos auxiliares, por ejemplo.

- 30 Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits pueden variar ampliamente para proveer unas concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que es necesario que ocurran durante los métodos de ensayo y además para optimizar sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. En las circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos del conjunto de elementos se puede proveer como un polvo seco, usualmente liofilizado, que incluye excipientes, que al disolverse proveerán una solución de reactivo con las
- 35 concentraciones apropiadas para llevar a cabo un método o ensayo en el que se utilizan las formas de realización de los conjugados de la presente invención. El conjunto de elementos además puede incluir una descripción escrita de un método según se describió antes.

Definiciones

- 40 Para los términos y expresiones que no se definieron antes específicamente de otra manera se proveen las siguientes definiciones, tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas. Se debe entender que la terminología que se utiliza aquí solo se usa con el propósito de describir formas de realización particulares y sin intenciones de servir de limitación.

La expresión "por lo menos", según se usa aquí, significa que la cantidad de artículos que se indica puede ser mayor o igual que a la cantidad que se define.

- 45 La expresión "aproximadamente", según se usa aquí, significa que el valor designado puede variar en más o menos doce por ciento, u once por ciento, o diez por ciento, o nueve por ciento, u ocho por ciento, o siete por ciento, o seis por ciento, o cinco por ciento, o cuatro por ciento, o tres por ciento, o dos por ciento, o uno por ciento. Por ejemplo, "aproximadamente 5" con una variancia de más o menos 10% se refiere a un rango de entre 4,5 y 5,5.

- 50 Las designaciones "primero" y "segundo" se utilizan únicamente con el propósito de diferenciar entre dos artículos tales como, por ejemplo, "primer miembro del sps" y "segundo miembro del sps", o "primer miembro de un sbp" y "segundo miembro de un sbp" y no se utilizan con la intención de insinuar ninguna secuencia ni orden ni importancia de un artículo sobre el otro ni tampoco ningún orden de agregados, por ejemplo.

Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen a los referentes en plural a menos que el contenido dicte claramente otra cosa.

5 Cuando no se haya definido antes específicamente, el término "sustancialmente" varía con el contexto según lo entienden aquellos con experiencia en el arte relevante y generalmente se refieren a por lo menos 70%, o por lo menos 80%, o por lo menos 90%, o por lo menos 95%, o por lo menos 99%, o 100%.

"Opcionalmente" se refiere a que el artículo que se especifica puede estar presente o puede no estar presente.

10 "Análogo del analito" es un analito modificado, que puede competir por un receptor con el análogo del analito, donde la modificación provee un medio para unir un análogo del analito a otra molécula. El análogo del analito usualmente diferirá del analito en más que el reemplazo de un hidrógeno por un enlace que conecta al análogo del analito con otra molécula, pero esto no es necesario. El análogo del analito puede unirse a un receptor o un compañero de unión para el analito de una manera similar al analito. El análogo puede ser, por ejemplo, un marcador conjugado del analito, una partícula conjugada del analito, y un anticuerpo dirigido contra el idiotipo de un anticuerpo para el analito, por ejemplo.

15 Los siguientes ejemplos describen adicionalmente unas formas de realización específicas de la invención a manera de ilustración y no como limitación y se utilizan con la intención de describir y no de limitar el alcance de la invención. Las partes y porcentajes que se divulgan aquí se dan en volumen, a no ser que se indique otra cosa.

20 Según se usa aquí, la expresión "asociado con" incluye a la unión covalente de una unidad con otra unidad ya sea por un enlace directo o a través de un grupo espaciador, unión no covalente de una unidad con otra unidad ya sea directamente o por medio de miembros de un par de unión específico unidos a las unidades, incorporación de una unidad en otra unidad por ejemplo por disolución de una unidad en otra unidad o por síntesis, y recubrimiento de una unidad con otra unidad, por ejemplo.

Ejemplos

Materiales:

25 A no ser que se indique otra cosa, los reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI) y se utilizaron tal como se recibieron.

Abreviaturas:

Ensayo LOCI® - inmunoensayo de luminiscencia de canal de oxígeno

HEPES - hidroxietil piperazina-ácido etansulfónico

30 Diluyente HEPES, pH 7,2 - 57,5 mM en agua con 20,15 mg/ml de NaCl, 0,428 mg/ml de EDTA, 1,15 mg/ml de Triton X-405, 1,73 mg/ml de Proclin 300 y 0,12 mg/ml de Neomicina, llevado a pH 7,2

Diluyente HEPES pH 8,0 - 57,5 mM en agua con 20,15 mg/ml de NaCl, 0,428 mg/ml de EDTA, 1,15 mg/ml de Triton® X405, 1,73 mg/ml de Proclin® 300 y 0,12 mg/ml de Neomicina, llevado a pH 8,0

Solución amortiguadora de pH para diálisis del anticuerpo - NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,0, NaCl 300 mM

ProSep - Solución amortiguadora de pH de unión a Proteína A - que se obtiene de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)

35 CMO - carboximetoxioxima

EDAC – clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EDTA - etilendiaminatetraacetato

NHS - N-hidroxisuccinimida

TLC – cromatografía en capa delgada

40 HPLC - cromatografía líquida de alto rendimiento

MeOP - 1-metoxi-2-propanol

Instrumento UPA – analizador de tamaños de partícula, UPA Instruments, West Chester, OH

Suero sin esteroides - adquirido de Bioreclamation LLC (Westbury NY) y dopado con cortisol para obtener una muestra al nivel de decisión médica, que estuviese libre de reactivos con reactividad cruzada

5 MES - ácido 2-(N-morfolino) etansulfónico

Solución amortiguadora de pH de MES - Solución amortiguadora de pH de MES 50 mM a pH 6, 5% de MeOP y 0,1 % de TWEEN 20®

Solución amortiguadora de pH de lavado de Hapteno - HEPES, Na HEPES, 57,5 mM 17,5 mg/ml de NaCl, 0,372 mg/ml de EDTA, 0,12 mg/ml de sulfato de Neomicina, 1 mg/ml de Triton X 405, 1,73 mg/ml de Proclin® 300

10 hrs - horas

min - minutos

p/p - peso en peso

ml - mililitros

mg - miligramos

15 g - gramos

mM - milimolar

20 El EPRM chemibead - EPRM chemibead (chemibead) se preparó de una manera similar al método descrito en la Patente de los EE.UU. No. 6.153.442 y la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 20050118727A. El EPRM chemibead comprende una capa interior de aminodextrano y una capa externa de dexal con funcionalidades aldehído libres. El dexal es dextrano aldehído; véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.929.049 y 7.172.906. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 y aproximadamente 40°C durante un período de entre aproximadamente 16 y aproximadamente 64 horas a un pH de entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,0, o aproximadamente 6, en un medio acuoso de pH amortiguado empleando un amortiguador de pH apropiado tal como, por ejemplo, MES u otros similares. La reacción se finaliza por agregado de un agente de finalización de la reacción apropiado tal como, por ejemplo, carboximetoxioxima (CMO), u otros similares y subsiguiente lavado de las partículas. El compuesto quimioluminiscente fue 2-(4-(N,N, di-tetradecil)-anilino-3-fenil tioxeno.

30 APRM chemibead – Una perla de poliestireno con europio quelado y tioxeno como composición quimioluminiscente. El APRM chemibead se prepara de una manera similar al método descrito en la Patente de los EE.UU. No. 6.153.442. El APRM chemibead comprende una capa de aminodextrano con funcionalidades amina libres. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de entre aproximadamente 0 y aproximadamente 40°C, durante un período de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 24 horas.

35 Reactivo Chemibead - hidrocortisona-3-CMO (hapteno) conjugada a perlas de APRM en una proporción 0,12:50 de hapteno:APRM. El Reactivo Chemibead concentrado se diluyó hasta una concentración final de 50 µg/ml en diluyente HEPES, pH 7,2.

Reactivo Sensibead - partícula de látex que comprende una tintura fotosensibilizante (bis-(trihexil)-silicio-t-butil-ftalocianina) preparada usando un método análogo al descrito en las Patentes de los EE.UU. Nos. 6.153.442, 7.022.529, 7.229.842 y la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 20050118727A. Las Sensibeads se diluyeron en diluyente HEPES, pH 7,2, hasta una concentración final de 700 µg/ml.

40 Preparación de los Reactivos

El anticuerpo A específico para el cortisol se preparó a partir del clon 16DC/17.7, isotipo IgG1ic, de acuerdo con los procedimientos estándar de hibridización de células somáticas que se expusieron anteriormente. El anticuerpo L específico para cortisol consistía en el clon XM210, isotipo IgG2a, monoclonal purificado de HyTest Ltd (Turku, Finlandia). Los anticuerpos se sometieron a una cromatografía analítica de exclusión por tamaño antes de cualquier

manipulación.

Los anticuerpos se biotinilaron usando una proporción molar 30:1 de NHS-PEO4-biotina (Pierce Chemical Company, Rockford ILO, número de parte 21330) a IgG1 intacta (como alternativa se puede usar la unidad F(ab')₂). La NHS-PEO4-Biotina se disolvió fresca a 10 mg/ml en solución amortiguadora de pH para diálisis del anticuerpo. Se agregó un total de 700 µL de esta solución de 10 mg/ml a un volumen de 13,5 ml de solución de 2,93 mg/ml de IgG1 (o F(ab')₂), para obtener como resultado una proporción molar 30:1 de biotina:F(ab')₂. La mezcla se mecía a 25 °C durante exactamente 3 horas. Se preparó una solución de glicina 200 mM disolviendo 750 mg glicina en Solución amortiguadora de pH para diálisis del anticuerpo hasta un volumen total de 50 ml. Al finalizar las 3 horas de la reacción de biotilación, se agregó a la mezcla de reacción 1,52 ml de la solución de glicina 200 mM. La mezcla con la reacción detenida se agitó suavemente otros 60 minutos adicionales a 25 °C.

Luego, el anticuerpo biotinilado se purificó usando HPLC preparativa usando solución amortiguadora de pH para diálisis del anticuerpo como fase móvil. Las fracciones que contenían el anticuerpo biotinilado se combinaron, excluyendo a las fracciones que contenían las trazas de agregados de alto peso molecular. Este reactivo se designó como el Reactivo Biotinilado, que es un anticuerpo.

Los fragmentos de F(ab')₂ se prepararon por medio de digestión enzimática de acuerdo con procedimientos bien conocidos.

Las EPRM chemibeads conjugadas al cortisol se prepararon de la siguiente manera: se agregó 1 mg de hidrocortisona-3-CMO a un vial de 2 ml (primer vial) equipado con una barra agitadora. A un segundo vial se le agregaron EDAC (15 mg) y NHS (15 mg), más 1,2 ml de acetonitrilo seco; al primer vial se le agregaron 200 µL de esta solución de EDAC/NHS. La mezcla se dejó agitando a la temperatura ambiente hasta que la TLC indicó la conversión completa a EPRM-EDA. A un tubo de centrífuga de 5 ml se le agregaron 4,16 ml (110 mg) de EPRM-EDA seguidos de 53 µL (0,26 mg) de hidrocortisona-3-CMO activada. El tubo de centrífuga se dejó meciedo durante toda la noche a la temperatura ambiente. La mezcla se transfirió a un tubo de centrífuga de 40 ml. Se agregó una solución amortiguadora de pH de MES, a pH 6, que contenía 5% de MeOP y TWEEN® 20 al 0,1 % para llevar el volumen del tubo a 35 ml. El tubo se centrifugó a 19000 rpm durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante. Las perlas se resuspendieron en 1 ml de mezcla amortiguadora de pH mezclando con una varilla agitadora. Se agregó más mezcla amortiguadora de pH para llevar el volumen del tubo a 35 ml. El tubo en hielo se sonicó con una potencia de 18-21 Watts durante 30 segundos. Las perlas se centrifugaron como antes llevando a cabo un total de cuatro lavados con solución amortiguadora de pH de MES-MeOP-TWEEN® 20. Después del último lavado, las perlas se resuspendieron en 1 ml de solución amortiguadora de pH de lavado con Hapteno en vez de la solución amortiguadora de pH de MES que se usó antes. Se llevaron a cabo dos lavados más. Las perlas se resuspendieron en suficiente solución amortiguadora de pH de lavado con Hapteno para dar una suspensión de 5 mg/ml. Las perlas se sonicaron con una potencia del 50% (sonicador de cubeta) durante 30 segundos. El tamaño de partícula se analizó en un instrumento UPA con una longitud de onda de 270 nm.

Ensayo de selección

El ensayo que se utilizó para propósitos de selección se condujo en el instrumento (sistema) DIMENSION® VISTA® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE). Inicialmente, se agregaron al recipiente 20 µL de reactivo de anticuerpo biotinilado con 15 µL de agua del sistema. Después de 22 segundos, se agregaron al recipiente la muestra de 15 µL con 15 µL de agua del sistema. Después de casi 4 minutos, se agregaron al recipiente 20 µL de reactivo Chemibead con 15 µL de agua del sistema. Aproximadamente 7 minutos después, se agregaron al recipiente 20 µL de reactivo Sensibead con 135 µL de agua del sistema. La lectura de LOCI® se tomó después de aproximadamente 5 minutos. Desde el agregado del primer reactivo hasta la lectura final, el ensayo demoró aproximadamente 16 minutos. Los contenidos del recipiente cuando se toma la lectura final fueron los siguientes: 2 ng/ml de reactivo de anticuerpo biotinilado, 4 µg/ml de reactivo Chemibead, 56 µg/ml de reactivo Sensibead, y 40 nL/ml de muestra. El ensayo tiene un formato competitivo, lo que significa que cuanto mayor sea la concentración de analito en la muestra, más pequeña será la generación de señal. Esto se debe a que en ausencia de analito, con el reactivo de anticuerpo biotinilado, el reactivo Chemibead, y el reactivo Sensibead se forma un complejo detectable. La presencia de analito reduce la proporción del reactivo de anticuerpo biotinilado que está libre para formar complejos detectables.

En las pruebas iniciales se utilizó reactivo de anticuerpo A biotinilado con los otros reactivos y la metodología que se describió anteriormente para analizar el suero sin esteroides con cortisol. Al suero sin esteroides se le agregaron individualmente 34 reactivos de un panel con reactividad cruzada con una determinada concentración de cortisol (5 ng/dL) y se realizaron los ensayos. Los datos de reactividad cruzada se calcularon de la siguiente manera:

$$\frac{100 \times ([\text{cortisol aparente}] \text{ en ng/dL}_{\text{reactividad cruzada}} - ([\text{cortisol}] \text{ en ng/dL}_{\text{control}}))}{\text{Concentración de reactivo con react. cruzada en ng/dL}}$$

Las mismas pruebas se llevaron a cabo usando reactivo de anticuerpo L biotinilado. La compilación de los porcentajes de las reactividades cruzadas para los 34 compuestos se denomina el perfil de reactividad cruzada. La concentración aparente de cortisol es el valor del cortisol que se obtiene cuando se analiza una muestra que contiene cortisol y la sustancia que interfiere, usando el método de prueba anterior, que también detecta en cierta medida a la sustancia que interfiere. La misma no es la verdadera concentración porque un método de prueba con reactividad cruzada detecta tanto al cortisol como a la sustancia que interfiere. En este ejemplo, la concentración aparente (el cortisol y la sustancia que interfiere) es mayor que la concentración de cortisol sola.

Se llevó a cabo un estudio adicional mezclando reactivo de anticuerpo A biotinilado con reactivo de anticuerpo L biotinilado en una mezcla 50:50, 80% de reactivo de anticuerpo A biotinilado:20% de reactivo de anticuerpo L biotinilado, 75% de reactivo de anticuerpo A biotinilado:25% de reactivo de anticuerpo L biotinilado, y 70% de reactivo de anticuerpo A biotinilado:30% de reactivo de anticuerpo L biotinilado. En las Figuras 1 y 2 se muestran, respectivamente las curvas de calibración y las curvas de calibración normalizadas. Las curvas muestran que la señal se puede modular usando un método de acuerdo con las formas de realización de la presente invención. La combinación de dos anticuerpos biotinilados no tuvo ningún efecto adverso sobre la curva de calibración. Las curvas de las proporciones de intermedio que se midieron se encontraron entre las curvas de los anticuerpos solos que se emplearon. Dichos reactivos se utilizaron para probar la reactividad cruzada en suero depurado con cortisol. Los perfiles de reactividad cruzada se muestran en la tabla 3 (se informa el porcentaje de reactividad cruzada para cinco configuraciones de ensayo usando diversas proporciones de anticuerpos A y L). Cada una de las proporciones intermedias da un perfil de reactividad cruzada que es mejor que para cualquiera de los anticuerpos individuales. Además, el perfil de reactividad cruzada demuestra que la reducción de la reactividad cruzada es más que la esperada en base a la combinación de los dos anticuerpos. Por ejemplo, con respecto a la cortisona, el porcentaje de reactividad cruzada usando 100% de reactivo de anticuerpo biotinilado A es 41,7 y el porcentaje de reactividad cruzada usando 100% de reactivo de anticuerpo biotinilado L es 1,4; sin embargo, el porcentaje de reactividad cruzada de la combinación 75-25 de los dos reactivos de anticuerpos biotinilado es 2,8. La incorporación de 25% de reactivo de anticuerpo biotinilado L es suficiente para reducir el porcentaje de reactividad cruzada con cortisona en más del 90%. Adicionalmente, la proporción de anticuerpo probó ser bastante robusta, ya que la variación de la composición porcentual del anticuerpo en cantidades relativamente pequeñas tuvo un mínimo efecto sobre el perfil de la reactividad cruzada porcentual.

Tabla 3

Anticuerpo biotinilado	100% A	80% A 20% L	75% A 25% L	70% A 30% L	100% L
Sustancia que interfiere:					
Aldosterona	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Alotetrahydrocortisol	4,7	6,0	6,5	7,1	8,1
Corticosterona	0,6	1,4	1,5	1,8	3,0
Cortisona	41,7	3,1	2,8	2,5	1,4
α -cortol	0,2	0,5	0,6	0,7	1,0
β -cortol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
α -cortolona	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
β -cortolona	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Deshidrocorticosterona	0,6	0,7	0,7	0,7	0,8
11-desoxicorticosterona	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8
11-desoxicortisol	39,8	3,7	3,2	3,0	1,7
21-desoxicortisol	8,3	6,9	6,9	7,2	6,4
21-desoxicortisona	36,4	3,1	2,7	2,5	1,4
Dexametasona	0,1	0,8	1,0	1,3	14,8
5 β -dihidrocortisol	0,4	0,8	0,9	1,0	1,3
20 α -dihidrocortisol	0,4	0,6	0,6	0,7	0,9
20 β -dihidrocortisol	0,6	1,3	1,5	1,6	2,1
20 α -dihidrocortisona	1,5	0,5	0,5	0,4	0,2
20 β -dihidrocortisona	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Acetato de fluorocortisona	35,3	17,0	20,9	27,8	69,3
6 β -hidroxycortisol	2,7	5,5	6,2	6,9	100,0
11 β -hidroxietiolanolona	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17 β -hidroxipregnenolona	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
17 α -hidroxiprogesterona	24,1	2,1	1,8	1,6	0,9
11 β -hidroxiprogesterona	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7
11-cetoetiolanolona	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6-metil-prednisolona	6,4	7,2	7,5	8,3	10,7
Prednisolona	13,6	12,4	12,2	12,4	10,2

Prednisona	26,5	1,5	1,3	1,1	0,6
Progesterona	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Sulfato de 21-cortisol	22,5	0,9	0,7	0,6	0,2
Tetrahydrocortisol	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
Tetrahydrocortisona	0,5	0,3	0,2	0,2	0,1
tetrahydro-11-desoxicortisol	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2

5

En base a los experimentos precedentes, se construyó una curva de calibración y la misma se muestra en las Figuras 1 y 2. Los dos anticuerpos biotinilados que se emplearon en el sistema de ensayo LOCI® que se describió anteriormente minimizaron la reactividad cruzada y optimizaron la curva estándar (usando una función de ajuste logit). La Figura 1 es una curva de calibración que muestra la señal del instrumento graficada como una función de la concentración de cortisol. La Figura 2 es una curva de calibración normalizada de la Figura 1. Como se puede ver, las curvas de las proporciones intermedias que se probaron se encontraron entre las curvas de los anticuerpos que se emplearon solos y demuestran un perfil optimizado de reactividad cruzada.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un analito de moléculas pequeñas en una muestra que se sospecha que contiene el analito de moléculas pequeñas y una o más sustancias diferentes que interfieren, donde el método comprende:

(a) proveer, en combinación, en un medio:

5 (i) la muestra, y

10 (ii) dos o más conjugados de trazador-anticuerpo diferentes donde el trazador de cada conjugado diferente es el mismo y donde el anticuerpo de cada conjugado diferente es diferente y donde cada anticuerpo diferente se une a por lo menos dos sitios epitópicos diferentes donde uno de los sitios epitópicos es un sitio de unión en común y uno de los sitios epitópicos no es un sitio de unión en común y donde los sitios epitópicos que no son en común son diferentes para cada anticuerpo diferente y donde cada uno de los sitios epitópicos que no son en común está presente en una respectiva sustancia que interfiere, donde el anticuerpo está unido covalentemente al trazador y donde el trazador es un miembro de un sistema que produce una señal, un miembro de un par de unión específico, o un complejo de miembros de un par de unión específico,

15 (b) incubar el medio en condiciones que permiten la unión de los diferentes anticuerpos a los sitios epitópicos, y

(c) analizar el medio para detectar la presencia y/o la cantidad de complejos que comprenden los sitios epitópicos y los conjugados de trazador-anticuerpo, donde la presencia y/o la cantidad de los complejos indica la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra,

20 donde el analito es mono-epitópico con un peso molecular de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 2000 y donde el sitio de unión en común es un sitio epitópico del analito y los sitios de unión que no son en común son sitios epitópicos de sustancias que interfieren.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la muestra es una excreción del cuerpo, se aspira del cuerpo, se escinde del cuerpo o se extrae del cuerpo.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el método es un método de ensayo en fase homogénea.

25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la combinación además comprende un análogo del analito y por lo menos uno del trazador o el análogo comprende un miembro de un sistema que produce una señal.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 donde la combinación además comprende un segundo anticuerpo donde el segundo anticuerpo se une a los complejos.

30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el segundo anticuerpo comprende un miembro de un sistema que produce una señal.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el analito se selecciona entre el grupo que consiste en hormonas y esteroides.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el analito es cortisol.

35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde los dos o más conjugados de trazador-anticuerpo diferentes se seleccionan por su perfil de unión al analito y a una o más sustancias que interfieren donde la cantidad de cada conjugado trazador-anticuerpo diferente que está presente en el medio es tal que se modula la reactividad cruzada y la respuesta señal-dosis en el ensayo.

Figura 1

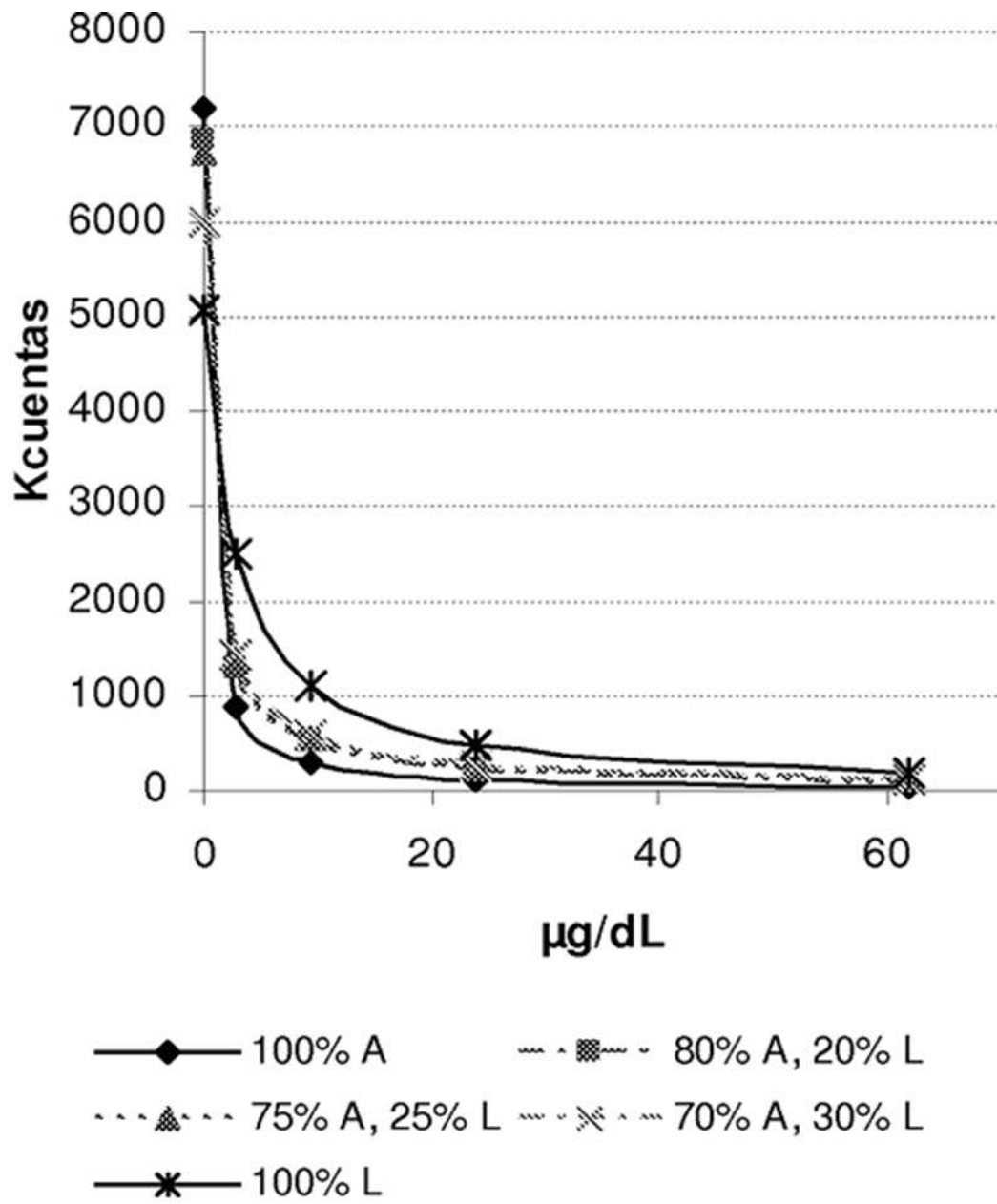


Figura 2

