

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 953**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2010 PCT/US2010/025433**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10104683**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2010 E 10751173 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2406630**

54 Título: **Inmunoensayos que emplean reactivos quimioluminiscentes no particulados**

30 Prioridad:

12.03.2009 US 403299

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

30.04.2018

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
1717 Deerfield Road
Deerfield, IL 60015-0778, US**

72 Inventor/es:

**SINGH, PRATAP;
ZHENG, YI, FENG;
GENG, LIPING;
JANZEN, ROLAND y
SCHELP, CARSTEN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

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

ES 2 665 953 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

Inmunoensayos que emplean reactivos quimioluminiscentes no particulados

Antecedentes

5 La presente invención se refiere a reactivos, que son capaces de generar señales, para su uso en métodos, composiciones y kits para la determinación de un analito en una muestra.

10 El campo del diagnóstico clínico ha experimentado una amplia expansión en los últimos años, tanto en lo que se refiere a la diversidad de materiales de interés que pueden determinarse fácilmente y con precisión, así como los métodos para la determinación. La mayoría de los métodos implican la generación de una señal en relación con la presencia y/o la cantidad de uno o más analitos en una muestra. Los compuestos luminiscentes, tales como los compuestos fluorescentes y los compuestos quimioluminiscentes, tienen una amplia aplicación en el campo de los ensayos debido a su capacidad para emitir luz. Las partículas, tales como las partículas de látex, los liposomas y similares se han utilizado en los ensayos. Tanto los colorantes absorbentes como los colorantes que confieren propiedades fluorescentes o quimioluminiscentes se han incorporado a las partículas. En un enfoque particular, las partículas que comprenden uno o más quelatos metálicos, tales como, por ejemplo, los quelatos de lantánidos, se emplean para la generación de una señal.

15 Un ensayo de luminiscencia inducida se describe en las patentes estadounidenses n.º 5.340.716 y 6.251.581. En un enfoque, el ensayo usa una partícula que incorpora un fotosensibilizador y una partícula marcadora que incorpora un compuesto quimioluminiscente. La partícula marcadora se conjuga con una pareja de enlace que es capaz de unirse a un analito para formar un complejo o a otro resto para formar un complejo en relación con la presencia del analito. Si el analito está presente, el fotosensibilizador y el compuesto quimioluminiscente entran en estrecha proximidad. El fotosensibilizador genera oxígeno de singlete y activa el compuesto quimioluminiscente cuando los dos marcadores están en estrecha proximidad. El compuesto quimioluminiscente activado produce posteriormente luz. La cantidad de luz producida se refiere a la cantidad del complejo formado, que, a su vez, se refiere a la cantidad de analito presente. En un enfoque particular, las partículas quimioluminiscentes comprenden uno o más quelatos metálicos, tales como, por ejemplo, los quelatos de lantánidos.

20 En una variación del método de luminiscencia inducida, se emplea un soporte particulado que comprende tanto (a) un fotosensibilizador capaz, con la irradiación, de generar oxígeno de singlete como (b) un compuesto quimioluminiscente capaz de activarse mediante oxígeno de singlete. El método permite la generación de luminiscencia retrasada, que puede realizarse con la irradiación del soporte. Los métodos tienen aplicación para la determinación de un analito en un medio sospechoso de contener el analito. Un método comprende someter un medio sospechoso de contener un analito a condiciones en las que se forma un complejo de parejas de enlace en relación con la presencia del analito y determinar si el complejo se ha formado mediante el empleo, como marcador, de una composición particulada que tiene tanto propiedades quimioluminiscentes como de fotosensibilizador. Con la activación de la propiedad de fotosensibilizador, se genera oxígeno de singlete y se activa la propiedad quimioluminiscente. Tales composiciones y métodos se describen en la patente estadounidense n.º 5.709.994.

25 El documento WO95/14928 divulga una composición que contiene quelato metálico para su uso en ensayos quimioluminiscentes en los que el reactivo quimioluminiscente comprende una partícula.

Sumario

30 La presente invención se refiere a un reactivo quimioluminiscente, tal como se define en la reivindicación 1, un método de diagnóstico, tal como se define en la reivindicación 14, un uso del reactivo quimioluminiscente, según la reivindicación 18, y un kit que comprende un reactivo quimioluminiscente, según la reivindicación 19.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 es una representación de un esquema para la producción de un reactivo quimioluminiscente de acuerdo con las presentes realizaciones.

45 La Figura 2 es un gráfico que representa una curva de calibración para un ensayo de TSH que utiliza un reactivo quimioluminiscente de acuerdo con las presentes realizaciones.

La Figura 3 es una representación en tabla de los resultados de un ensayo de TSH que utiliza un reactivo quimioluminiscente de acuerdo con las presentes realizaciones y que muestra la separación de la señal obtenida entre los calibradores.

50

La Figura 4 es un gráfico que representa los resultados de un estudio de estabilidad de un reactivo quimioluminiscente de acuerdo con las presentes realizaciones.

La Figura 5 es un gráfico que representa los resultados de un estudio de estabilidad de un reactivo quimioluminiscente de acuerdo con las presentes realizaciones.

5 Descripción detallada de realizaciones específicas

Discusión general

Las realizaciones de los presentes métodos y reactivos se refieren a reactivos quimioluminiscentes para la determinación de la presencia y/o cantidad de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito. El reactivo es no particulado y comprende una pareja de enlace para el analito y una composición quimioluminiscente que comprende un compuesto olefínico y un quelato metálico. El reactivo quimioluminiscente, de acuerdo con la presente divulgación, presenta una buena solubilidad en un medio acuoso, tal como un medio de ensayo acuoso. El reactivo quimioluminiscente no particulado tiene una estabilidad aumentada para su uso en ensayos para la detección de analitos; además, el reactivo presenta una buena respuesta de señal a los cambios en la concentración de analito. Cuando se usa en un ensayo, el reactivo quimioluminiscente no particulado, de acuerdo con la presente divulgación, es soluble en medios de ensayo acuosos y proporciona un rendimiento optimizado que incluye precisión y sensibilidad, así como estabilidad de la señal producida.

El rendimiento de un formato de ensayo particular en el extremo inferior del intervalo de decisión médica se puede controlar mediante el control de la diferencia en la cantidad de señal obtenida para los calibradores que abarcan el intervalo de concentración de interés sospechado del analito. Se desea una gran diferencia o separación entre la señal para los calibradores tales como, por ejemplo, el calibrador L1 y el calibrador L2 o el calibrador L2 y el calibrador L3. Por ejemplo, pueden emplearse seis calibradores, denominados de manera arbitraria L1-L6. La relación de señal respecto a ruido puede evaluarse mediante la determinación de una cantidad de señal usando un calibrador que no contiene analito, denominado de manera arbitraria calibrador L1 (fondo) y la cantidad de señal obtenida para un calibrador que contiene una primera cantidad conocida de analito por encima de cero, denominado de manera arbitraria calibrador L2. Esta evaluación también puede incluir la determinación de una cantidad de señal usando el calibrador L1 y la cantidad de señal para un calibrador que contiene una segunda cantidad conocida de analito por encima de cero, denominado de manera arbitraria calibrador L3. Tal evaluación también puede incluir tal determinación usando los calibradores L4, L5, L6 y así sucesivamente. Las realizaciones tratadas en el presente documento proporcionan un mejor rendimiento en un ensayo para un analito, en comparación con los reactivos no de acuerdo con la presente invención.

Se desea una gran diferencia entre la señal para los calibradores, por ejemplo, el calibrador L1 y el calibrador L2 o el calibrador L1 y el calibrador L6. En cuanto a una buena sensibilidad en el intervalo de decisión médica, la diferencia en la señal detectada entre el calibrador L1 y el calibrador L2 es de al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 100 %, al menos aproximadamente el 125 %, al menos aproximadamente el 150 %, al menos aproximadamente el 175 %, al menos aproximadamente el 200 %, al menos aproximadamente el 225 %, al menos aproximadamente el 250 %, al menos aproximadamente el 275 %, al menos aproximadamente el 300 %, al menos aproximadamente el 325 %, al menos aproximadamente el 350 %, al menos aproximadamente el 375 %, al menos aproximadamente el 400 %, al menos aproximadamente el 425 % y así sucesivamente. En algunas realizaciones, la señal detectada para el calibrador L6 es de al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces mayor que la señal detectada para el calibrador L1. En función del formato de ensayo, la diferencia en la señal puede ser un aumento de señal o una disminución de señal. Típicamente, los resultados de los ensayos que usan los calibradores se presentan en un formato de gráfico en el que la cantidad de señal se representa frente a la concentración de los calibradores. De acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, la pendiente de la línea entre el calibrador L1 y el calibrador L2, en general, está más inclinada, en comparación con los resultados obtenidos con los reactivos de ensayo no de acuerdo con la presente divulgación. Además, la pendiente de la línea del calibrador L1 al calibrador L6 está normalmente más inclinada, en comparación con los resultados obtenidos con los reactivos de ensayo no de acuerdo con la presente divulgación.

Tal como se ha mencionado anteriormente, las realizaciones de los presentes reactivos quimioluminiscentes son no particuladas. Como tales, los reactivos se distinguen de aquellos empleados en los ensayos de luminiscencia inducida conocidos mencionados anteriormente, que emplean reactivos quimioluminiscentes particulados. Los presentes reactivos quimioluminiscentes presentan una buena solubilidad en medios acuosos. En las realizaciones de los reactivos quimioluminiscentes, una pareja de enlace para el analito se une covalente o no covalentemente a una composición quimioluminiscente que comprende un compuesto olefínico y un quelato metálico.

La pareja de enlace para el analito puede enlazarse covalentemente a la composición quimioluminiscente mediante un enlace. Por otro lado, la pareja de enlace para el analito puede enlazarse covalentemente a la composición quimioluminiscente mediante un grupo de enlace. En algunas realizaciones, el grupo de unión es hidrófilo. El término "hidrófilo/a" o "hidrofilicidad" se refiere a un resto que es polar y, por tanto, prefiere moléculas polares y prefiere disolventes polares. Las moléculas hidrófilas tienen afinidad con otros restos hidrófilos, en comparación con los restos hidrófobos. El grado de hidrofilicidad se controla mediante el número de heteroátomos en el grupo de unión.

En algunas realizaciones, el grupo de unión es una macromolécula y puede ser polimérica. La macromolécula polimérica es, en general, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas o más de longitud, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 8.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 8.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 8.000 unidades monoméricas de longitud o de aproximadamente 100 a aproximadamente 7.000 unidades monoméricas de longitud y similares. El número de unidades monoméricas depende del número de átomos en la cadena de unidad monomérica, las composiciones de la unidad monomérica y así sucesivamente.

El peso molecular de la macromolécula polimérica es de al menos aproximadamente 2.000. El peso molecular puede ser de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 10.000.000 o más, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 8.000.000, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 6.000.000, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 5.000.000 o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 4.000.000, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 3.000.000 o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 2.000.000, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 1.000.000, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 10.000.000 o más, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 8.000.000, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 6.000.000, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 5.000.000 o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 4.000.000, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 3.000.000 o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 2.000.000, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 1.000.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 10.000.000 o más, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 8.000.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 6.000.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 5.000.000 o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 4.000.000 o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 3.000.000 o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 2.000.000 o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.000.000 y similares.

La macromolécula polimérica puede ser lineal o ramificada o una combinación de las mismas. Un polímero lineal comprende una cadena lineal de átomos y un polímero ramificado comprende una cadena ramificada de átomos. Cada átomo de la cadena lineal puede tener uno o más sustituyentes en lugar de hidrógeno. En algunas realizaciones, el polímero puede ser un copolímero que comprende más de un tipo de unidad monomérica. La relación de las diferentes unidades monoméricas en el polímero puede ser alternada, aleatoria, periódica y similares y también puede estar en una disposición de copolímero de bloques en la que los bloques de unidades monoméricas repetidas forman la cadena polimérica.

En algunas realizaciones, una o más de las unidades monoméricas de la macromolécula polimérica comprenden átomos de carbono y uno o más heteroátomos, tales como, por ejemplo, oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo y similares. Las unidades monoméricas pueden comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 átomos o más, o de 5 a aproximadamente 50 átomos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 átomos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 átomos, o de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 átomos, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 40 átomos o más, o de 5 a aproximadamente 40 átomos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 átomos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 átomos, o de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 átomos, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 átomos o más, o de 5 a aproximadamente 30 átomos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 átomos o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 átomos, sin contar el hidrógeno, y pueden comprender una cadena de 2 a aproximadamente 30 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 átomos o más, o de 10 a aproximadamente 30 átomos, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 átomos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 átomos, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 átomos o más, o de 5 a aproximadamente 25 átomos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 átomos, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 átomos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 átomos, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos o más, o de 5 a aproximadamente 20 átomos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 átomos, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 átomos, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 átomos o de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 átomos, seleccionados cada uno independientemente entre el grupo que normalmente consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo.

El número de heteroátomos en una unidad monomérica de la macromolécula polimérica puede variar de aproximadamente 0 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 0 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 0 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 0 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 o de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 y similares. En algunas realizaciones, el número de heteroátomos es suficiente para hacer que el grupo de unión sea hidrófilo y aumentar la solubilidad del reactivo quimioluminiscente de acuerdo con las presentes realizaciones. A este respecto, el número de heteroátomos en la unidad monomérica de la macromolécula polimérica puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 y similares. Cuando los heteroátomos están presentes, el oxígeno está normalmente presente como oxo u oxi, enlazado a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo, el nitrógeno está normalmente presente como azo, ciano, isociano, nitro, nitroso, amido o amino, normalmente enlazado a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el azufre es análogo al oxígeno; mientras el fósforo se enlaza al carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, normalmente como mono- o diéster de fosfonato y fosfato.

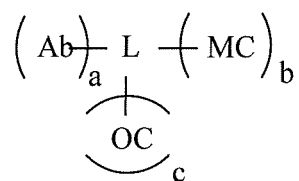
Las funcionalidades comunes en la formación de un enlace covalente entre el grupo de unión y la molécula a conjugar son alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter y carboxilato, sulfonato, y tioésteres, amidas y ésteres de fosfato. En su mayoría, cuando un grupo de unión tiene una funcionalidad de unión (funcionalidad para la reacción con un resto), tal como, por ejemplo, un grupo no oxocarbonilo que incluye análogos de azufre y nitrógeno, un grupo fosfato, un grupo amino, un agente alquilante, tal como halo o tosilalquilo, un oxi (hidroxilo o el análogo de azufre, mercapto) oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona) o una olefina activa, tal como una sulfona de vinilo o éster α -, β -insaturado, estas funcionalidades se unen a grupos amina, grupos carboxilo, olefinas activas, agentes alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. En caso de que se unan una amina y un ácido carboxílico, o su derivado de nitrógeno o derivado de ácido fosfórico, se forman amidas, amidinas y fosforamidas, respectivamente. En caso de que se unan un mercaptano y una olefina activada, se forman tioéteres. En caso de que se unan un mercaptano y un agente alquilante, se forman tioéteres. En caso de que se unan un aldehído y una amina, en condiciones de reducción, se forma una alquilamina. En caso de que se unan una cetona o un aldehído y una hidroxilamina (incluyendo los derivados de los mismos en los que un sustituyente está en lugar del hidrógeno del grupo hidroxilo), se forma una funcionalidad de oxima (=N-O-). En caso de que se unan un ácido carboxílico o un ácido de fosfato y un alcohol, se forman ésteres.

En algunas realizaciones, el grupo de unión no es una macromolécula y tiene un peso molecular menor de aproximadamente 2.000, o menor de aproximadamente 1.500, o menor de aproximadamente 1.000, o menor de aproximadamente 500 o similares. Tales grupos de unión pueden comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 átomos, o de 4 a aproximadamente 150 átomos o de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 átomos, sin contar el hidrógeno, y pueden comprender una cadena de 2 a aproximadamente 100 átomos, o de 3 a aproximadamente 90 átomos, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 80 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 70 átomos o similares, seleccionados cada uno independientemente entre el grupo que normalmente consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo. El número de heteroátomos en tales grupos de unión depende del tamaño del grupo de unión y, normalmente, variará de aproximadamente 0 a aproximadamente 50, de 1 a aproximadamente 45 o de aproximadamente 2 a aproximadamente 40. Los heteroátomos pueden estar en las formas indicadas anteriormente en la discusión relacionada con los grupos de unión macromoleculares. En algunas realizaciones, el número de heteroátomos es suficiente para hacer que el grupo de unión sea hidrófilo y aumentar la solubilidad de la composición resultante de acuerdo con las presentes realizaciones. A este respecto, el número de heteroátomos en el grupo de unión depende del tamaño del grupo de unión y puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 50, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 40, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 40, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 40, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 30, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 30, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 y similares.

Una macromolécula polimérica como grupo de unión puede ser un material de origen natural o una construcción sintética. En algunas realizaciones, el grupo de unión macromolecular polimérico es un polipéptido. Los ejemplos de polipéptidos, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen proteínas, tales como, por ejemplo, albúminas, gammaglobulinas, inmunoglobulinas, hemocianinas, polipéptidos sintéticos y similares. Los ejemplos de otras macromoléculas poliméricas, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen dendrímeros, carboxilatos poliméricos (por ejemplo, ácido poliaspártico, ácido poliglútamico, ácido poligalacturónico, ácido polimetacrílico, etc.), aminas poliméricas (por ejemplo, amina de polietileno, polilisina, poliglutamina, imina de polietileno, polialquilamina,

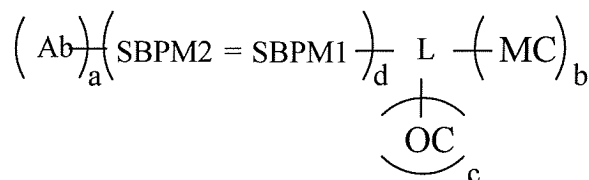
etc.), éteres poliméricos (óxido de polietileno o polietilenglicoles, etc.), tioéteres poliméricos (por ejemplo, tioéteres de polietileno, etc.), sulfhidrilos poliméricos (por ejemplo, policisteína) y así sucesivamente.

La pareja de enlace para el analito puede enlazarse a una composición quimioluminiscente de varias maneras diferentes, algunas de estas se discuten más adelante a modo de ilustración y no de limitación. En algunas realizaciones, el grupo de unión es una proteína y los componentes de la composición quimioluminiscente, a saber, un compuesto olefínico y un quelato metálico, se enlazan, cada uno, a la proteína, a la que también se enlaza una pareja de enlace para el analito. Esta realización se ilustra tal como sigue:



en la que Ab es una pareja de enlace para el analito (en este ejemplo, un anticuerpo), L es un grupo de unión de proteína, MC es un quelato metálico y OC es un compuesto olefínico y a, b y c son independientemente un número entero de 1 a aproximadamente 10, o de 1 a aproximadamente 9, o de 1 a aproximadamente 8, o de 1 a aproximadamente 7, o de 1 a aproximadamente 6, o de 1 a aproximadamente 5, o de 1 a aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3, o de 1 a aproximadamente 2, o de 2 a aproximadamente 10, o de 2 a aproximadamente 9, o de 2 a aproximadamente 8, o de 2 a aproximadamente 7, o de 2 a aproximadamente 6, o de 2 a aproximadamente 5, o de 2 a aproximadamente 4, o de 2 a aproximadamente 3, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, por ejemplo. Diversas funcionalidades, tales como amina, carboxilo y similares, están presentes en la proteína para la unión al MC, OC y Ab y, tal como puede observarse, múltiples moléculas de MC, OC y Ab pueden enlazarse a la proteína. El número de moléculas de cada uno que puede enlazarse depende del tamaño de la proteína, del tamaño del MC y OC y del tamaño del anticuerpo.

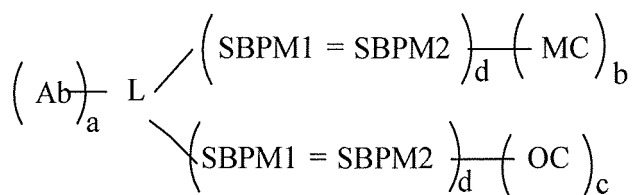
En algunas realizaciones, el grupo de unión es una proteína y los componentes de la composición quimioluminiscente, a saber, un compuesto olefínico y un quelato metálico, se enlazan, cada uno, a la misma molécula de la proteína. La proteína tiene una o más moléculas de un elemento de un par de enlace específico enlazadas a la misma. La pareja de enlace para el analito tiene una o más moléculas del otro elemento del par de enlace específico enlazadas a la misma. El enlace de los elementos del par de enlace específico da como resultado el enlace covalente de la pareja de enlace para el analito a la proteína. Esta realización se ilustra tal como sigue:



en la que Ab es una pareja de enlace para el analito (en este ejemplo, un anticuerpo), L es un grupo de unión de proteína, MC es un quelato metálico, OC es un compuesto olefínico, SBPM1 y SBPM2 son elementos complementarios de un par de enlace específico, = es un enlace no covalente, y a, b, c y d son independientemente un número entero de 1 a aproximadamente 10, o de 1 a aproximadamente 9, o de 1 a aproximadamente 8, o de 1 a aproximadamente 7, o de 1 a aproximadamente 6, o de 1 a aproximadamente 5, o de 1 a aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3, o de 1 a aproximadamente 2, o de 2 a aproximadamente 10, o de 2 a aproximadamente 9, o de 2 a aproximadamente 8, o de 2 a aproximadamente 7, o de 2 a aproximadamente 6, o de 2 a aproximadamente 5, o de 2 a aproximadamente 4, o de 2 a aproximadamente 3, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, por ejemplo. Diversas funcionalidades, tales como amina, carboxilo y similares, están presentes en la proteína para la unión al MC, OC y SBPM1 y, tal como puede observarse, múltiples moléculas de MC, OC y SBPM1 pueden enlazarse a la proteína. El número de moléculas de cada uno que puede enlazarse depende del tamaño de la proteína, del tamaño del MC, OC, SBPM1 y SBPM2 y del tamaño del anticuerpo.

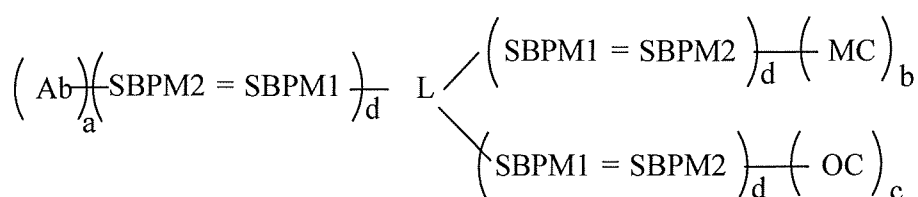
En algunas realizaciones, el grupo de unión es una proteína y los componentes de la composición quimioluminiscente, a saber, un compuesto olefínico y un quelato metálico, se enlazan, cada uno, a la misma molécula de la proteína. La proteína tiene una o más moléculas de un elemento de un par de enlace específico enlazadas a la misma, así como una o más moléculas del anticuerpo. El OC y MC tienen, cada uno,

independientemente, una o más moléculas del otro elemento del par de enlace específico enlazadas a los mismos. El enlace de los elementos del par de enlace específico da como resultado el enlace no covalente de OC y MC a la proteína. Esta realización se ilustra tal como sigue:



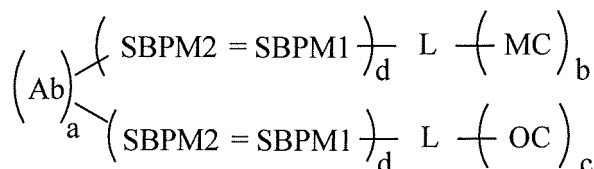
5 en la que Ab es una pareja de enlace para el analito (en este ejemplo, un anticuerpo), L es un grupo de unión de proteína, MC es un quelato metálico, OC es un compuesto olefínico, SBPM1 y SBPM2 son elementos complementarios de un par de enlace específico, = es un enlace no covalente, y a, b, c y d son independientemente un número entero de 1 a aproximadamente 10, o de 1 a aproximadamente 9, o de 1 a aproximadamente 8, o de 1 a aproximadamente 7, o de 1 a aproximadamente 6, o de 1 a aproximadamente 5, o de 1 a aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3, o de 1 a aproximadamente 2, o de 2 a aproximadamente 10, o de 2 a aproximadamente 9, o de 2 a aproximadamente 8, o de 2 a aproximadamente 7, o de 2 a aproximadamente 6, o de 2 a aproximadamente 5, o de 2 a aproximadamente 4, o de 2 a aproximadamente 3, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, por ejemplo. Diversas funcionalidades, tales como amina, carboxilo y similares, están presentes en la proteína para la unión al MC, OC y SBPM1 y, tal como puede observarse, múltiples moléculas de MC, OC y SBPM1 pueden enlazarse a la proteína. El número de moléculas de cada uno que puede enlazarse depende del tamaño de la proteína, del tamaño del MC, OC, SBPM1 y SBPM2 y del tamaño del anticuerpo. Debe observarse que, en la realización anterior, el par de enlace específico al que pertenecen el SBPM1 y SBPM2 puede ser el mismo para la unión de OC y MC o pueden emplearse dos pares de enlace específicos diferentes, uno para OC y uno para MC.

En algunas realizaciones, el grupo de unión es una proteína y los componentes de la composición quimioluminiscente, a saber, un compuesto olefínico y un quelato metálico, se enlazan, cada uno, a la misma molécula de la proteína. La proteína tiene una o más moléculas de un elemento de un par de enlace específico enlazadas a la misma. El OC y MC tienen, cada uno, independientemente, una o más moléculas del otro elemento del par de enlace específico enlazadas a los mismos. El enlace de los elementos del par de enlace específico da como resultado el enlace no covalente de OC y MC a la proteína. La pareja de enlace para el analito también tiene una o más moléculas del otro elemento del par de enlace específico enlazadas a la misma. El enlace de los elementos del par de enlace específico da como resultado el enlace covalente de la pareja de enlace para el analito a la proteína. Esta realización se ilustra tal como sigue:



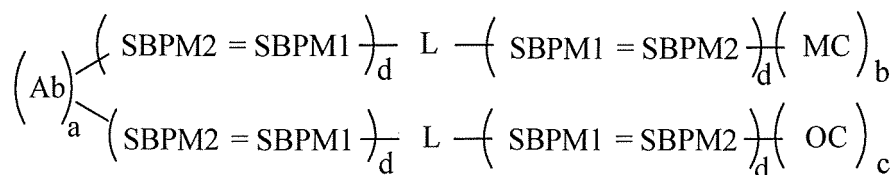
en la que Ab es una pareja de enlace para el analito (en este ejemplo, un anticuerpo), L es un grupo de unión de proteína, MC es un quelato metálico, OC es un compuesto olefínico, SBPM1 y SBPM2 son elementos complementarios de un par de enlace específico, = es un enlace no covalente, y a, b, c y d son independientemente un número entero de 1 a aproximadamente 10, o de 1 a aproximadamente 9, o de 1 a aproximadamente 8, o de 1 a aproximadamente 7, o de 1 a aproximadamente 6, o de 1 a aproximadamente 5, o de 1 a aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3, o de 1 a aproximadamente 2, o de 2 a aproximadamente 10, o de 2 a aproximadamente 9, o de 2 a aproximadamente 8, o de 2 a aproximadamente 7, o de 2 a aproximadamente 6, o de 2 a aproximadamente 5, o de 2 a aproximadamente 4, o de 2 a aproximadamente 3, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, por ejemplo. Diversas funcionalidades, tales como amina, carboxilo y similares, están presentes en la proteína para la unión al SBPM1 y, tal como puede observarse, múltiples moléculas de SBPM1 pueden enlazarse a la proteína. El número de moléculas de cada uno que puede enlazarse depende del tamaño de la proteína, del tamaño del MC, OC, SBPM1 y SBPM2 y del tamaño del anticuerpo. Debe observarse que, en la realización anterior, el par de enlace específico al que pertenecen el SBPM1 y SBPM2 puede ser el mismo para la unión de OC, MC y el anticuerpo o pueden emplearse dos o tres pares de enlace específicos diferentes, uno para OC, uno para MC y uno para el anticuerpo.

En algunas realizaciones, el grupo de unión es una proteína y los componentes de la composición quimioluminiscente, a saber, un compuesto olefínico y un quelato metálico, se enlazan, respectivamente, a diferentes moléculas de la proteína. La proteína tiene una o más moléculas de un elemento de un par de enlace específico enlazadas a la misma. La pareja de enlace para el analito tiene una o más moléculas del otro elemento del par de enlace específico enlazadas a la misma. El enlace de los elementos del par de enlace específico da como resultado el enlace covalente de la pareja de enlace para el analito a la proteína. Esta realización se ilustra tal como sigue:



en la que Ab es una pareja de enlace para el analito (en este ejemplo, un anticuerpo), L es un grupo de unión de proteína, MC es un quelato metálico, OC es un compuesto olefínico, SBPM1 y SBPM2 son elementos complementarios de un par de enlace específico, = es un enlace no covalente, y a, b, c y d son independientemente un número entero de 1 a aproximadamente 10, o de 1 a aproximadamente 9, o de 1 a aproximadamente 8, o de 1 a aproximadamente 7, o de 1 a aproximadamente 6, o de 1 a aproximadamente 5, o de 1 a aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3, o de 1 a aproximadamente 2, o de 2 a aproximadamente 10, o de 2 a aproximadamente 9, o de 2 a aproximadamente 8, o de 2 a aproximadamente 7, o de 2 a aproximadamente 6, o de 2 a aproximadamente 5, o de 2 a aproximadamente 4, o de 2 a aproximadamente 3, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, por ejemplo. Diversas funcionalidades, tales como amina, carboxilo y similares, están presentes en la proteína para la unión al MC, OC y SBPM1 y, tal como puede observarse, múltiples moléculas de MC, OC y SBPM1 pueden enlazarse a la proteína. El número de moléculas de cada uno que puede enlazarse depende del tamaño de la proteína, del tamaño del MC, OC, SBPM1 y SBPM2 y del tamaño del anticuerpo. Debe observarse que, en la realización anterior, el par de enlace específico al que pertenecen el SBPM1 y SBPM2 puede ser el mismo para la unión de OC y MC o pueden emplearse dos pares de enlace específicos diferentes, uno para OC y uno para MC. También debe observarse que, en la realización anterior, L puede ser el mismo o diferente para OC y MC.

En algunas realizaciones, el grupo de unión es una proteína y los componentes de la composición quimioluminiscente, a saber, un compuesto olefínico y un quelato metálico, se enlazan, respectivamente, a diferentes moléculas de la proteína por medio de enlace no covalente. La proteína tiene una o más moléculas de un elemento de un par de enlace específico enlazadas a la misma. La pareja de enlace para el analito tiene una o más moléculas del otro elemento del par de enlace específico enlazadas a la misma. El enlace de los elementos del par de enlace específico da como resultado el enlace covalente de la pareja de enlace para el analito a la proteína. El OC y MC también tienen, cada uno, independientemente, una o más moléculas del otro elemento del par de enlace específico enlazadas a los mismos. El enlace de los elementos del par de enlace específico da como resultado el enlace no covalente de OC y MC a la proteína. Esta realización se ilustra tal como sigue:



en la que Ab es una pareja de enlace para el analito (en este ejemplo, un anticuerpo), L es un grupo de unión de proteína, MC es un quelato metálico, OC es un compuesto olefínico, SBPM1 y SBPM2 son elementos complementarios de un par de enlace específico, = es un enlace no covalente, y a, b, c y d son independientemente un número entero de 1 a aproximadamente 10, o de 1 a aproximadamente 9, o de 1 a aproximadamente 8, o de 1 a aproximadamente 7, o de 1 a aproximadamente 6, o de 1 a aproximadamente 5, o de 1 a aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3, o de 1 a aproximadamente 2, o de 2 a aproximadamente 10, o de 2 a aproximadamente 9, o de 2 a aproximadamente 8, o de 2 a aproximadamente 7, o de 2 a aproximadamente 6, o de 2 a aproximadamente 5, o de 2 a aproximadamente 4, o de 2 a aproximadamente 3, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, por ejemplo. Diversas funcionalidades, tales como amina, carboxilo y similares, están presentes en la proteína para la unión al MC, OC y SBPM1 y, tal como puede observarse, múltiples moléculas de MC, OC y SBPM1 pueden enlazarse a la proteína. El número de moléculas de cada uno que puede enlazarse depende del tamaño de la proteína, del tamaño del MC, OC, SBPM1 y SBPM2 y del

tamaño del anticuerpo. Debe observarse que, en la realización anterior, el par de enlace específico al que pertenecen el SBPM1 y SBPM2 puede ser el mismo para la unión de OC, MC y el anticuerpo o pueden emplearse dos o tres pares de enlace específicos diferentes, uno para OC y uno para MC y uno para el anticuerpo. También debe observarse que, en la realización anterior, L puede ser el mismo o diferente para OC y MC.

- 5 El compuesto olefínico es uno que es capaz de reaccionar con el oxígeno de singlete. En algunas realizaciones, la reacción de las olefinas con el oxígeno de singlete es una adición de $2 + 2$ para formar un dioxetano. Los compuestos olefínicos adecuados normalmente no tienen ningún grupo C-H saturado unido a un carbono olefínico, excepto carbonos de cabeza de puente no reactivos, y, en algunas realizaciones, tienen uno o más grupos donantes de electrones directamente unidos al carbono olefínico o en conjugación con la olefina. Los dioxetanos pueden disociarse espontáneamente o mediante calentamiento con quimioluminiscencia espontánea, o los grupos carbonilo que se forman pueden formarse como parte de un grupo fluorescente o ser capaces de experimentar reacciones posteriores que conducen a una molécula fluorescente. Como alternativa, la reacción de disociación puede conducir a una separación de un grupo de inactivación de un grupo fundamentalmente fluorescente que, de este modo, recupera su propiedad fluorescente.
- 10
- 15 En algunas realizaciones, la reacción del oxígeno de singlete con las olefinas es una cicloadición de $4 + 2$ con dienos, normalmente compuestos aromáticos, tales como naftalenos, antracenos, oxazoles, furanos, indoles y similares. Tal reacción conduce inicialmente a un endoperóxido. En algunos casos, los endoperóxidos pueden reordenarse en anhídridos o ésteres activos que sean capaces de reaccionar con un grupo adecuadamente colocado para proporcionar una lactona o lactama que puede ser fluorescente. Como alternativa, los endoperóxidos pueden oxidar un precursor de compuesto fluorescente o quimioluminiscente. Los endoperóxidos también pueden disociarse espontáneamente o al calentar con emisión quimioluminiscente u oxidar un colorante leuco fluorescente.
- 20

En algunas realizaciones, la reacción del oxígeno de singlete con las olefinas es la reacción de "eno" que produce un alilhidroperóxido. Las olefinas adecuadas tienen un C-H saturado reactivo unido a un carbono olefínico. Este producto puede reaccionar con un éster activo en la misma molécula para formar un dioxetanona que puede disociarse espontáneamente o al calentar con emisión quimioluminiscente.

25

En general, las olefinas de interés son aquellas que se someten a una reacción química tras la reacción con el oxígeno de singlete para formar un producto de reacción metaestable, normalmente un dioxetano o endoperóxido, que es capaz de descomponerse con la emisión simultánea o posterior de luz, normalmente dentro del intervalo de longitud de onda de 250 a 1.200 nm. Las olefinas ricas en electrones preferidas son las que contienen grupos donantes de electrones. Los ejemplos de tales olefinas ricas en electrones son los éteres de enol, enaminas, 9-alkiliden-N-alkilacridanos, arilviniléteres, 1,4-dioxenos, 1,4-tioxenos, 1,4-oxazinas, arilimidazoles, 9-alkiliden-xantanos y lucigenina.

30

Los ejemplos de olefinas quimioluminiscentes ricas en electrones adecuadas se exponen en la patente estadounidense n.º 5.709.994. Tales olefinas, en general, tienen un grupo donante de electrones en conjugación con la olefina.

35

Los dioxetanos pueden ser luminiscentes solos o en conjunción con un aceptor de energía fluorescente. Los éteres de enol son ejemplos de tales olefinas. En algunas realizaciones, los compuestos de éter de enol tendrán al menos un grupo arilo enlazado a los carbonos olefínicos en los que el anillo de arilo se sustituye con un grupo donador de electrones en una posición que aumenta la reactividad de la olefina para el oxígeno de singlete y/o confiere fluorescencia al producto de disociación del dioxetano resultante. El grupo donante de electrones puede ser, por ejemplo, hidroxilo, alcoxi, amino disustituido, alquiltio, furilo, pirilo, etc. Preferentemente, los éteres de enol tienen un grupo donador de electrones enlazado directamente a un carbono olefínico.

40

Las enaminas son otro ejemplo de tales olefinas. En general, las enaminas útiles se regirán por las reglas expuestas anteriormente para los éteres de enol. Otra familia de quimioluminiscentes son los 2,4,5-trifenilimidazoles, con lofina como el nombre común para el producto original. Los análogos quimioluminiscentes incluyen sustituyentes de para-dimetilamino y para-metoxi. Otras olefinas quimioluminiscentes que satisfacen los requisitos dados anteriormente pueden encontrarse en la solicitud de patente europea n.º 0.345.776.

45

Además del compuesto olefínico, la composición quimioluminiscente comprende un complejo de un metal y uno o más agentes quelantes. Los ejemplos de metales que forman parte del complejo incluyen, por ejemplo, metales de tierras raras, metales del Grupo VIII y similares. Los metales de tierras raras comprenden lantánidos (metales de lantánidos) (los 15 elementos de lantano o lutecio, números atómicos 57-71). Los metales de tierras raras de interés particular incluyen europio, terbio, disprosio y samario. Los metales del Grupo VIII de interés particular incluyen osmio y rutenio. En algunas realizaciones, los metales de tierras raras tienen un estado de oxidación de más tres, el rutenio tiene un estado de oxidación de más dos y el osmio tiene un estado de oxidación de más dos. En determinadas realizaciones, el metal se selecciona entre el grupo que consiste en europio, terbio, disprosio, samario, osmio y rutenio. En algunas realizaciones, el metal está al menos hexacoordinado; sin embargo, el metal puede estar octacoordinado o más altamente coordinado en función del agente quelante metálico.

50

55

El agente quelante metálico es un compuesto en el que dos o más átomos de la misma molécula pueden estar coordinados con un metal para formar un quelato metálico. Los dos o más átomos pueden ser, por ejemplo, oxígeno, nitrógeno, azufre y similares. Los átomos pueden estar en la forma de una o más funcionalidades, tales como, por ejemplo, cetona, aldehído, hidroxilo, amina, tiocetona, tioaldehído, tiol y similares. Las funcionalidades pueden ser parte de un grupo bencilo o un sistema de anillo aromático condensado derivado de, por ejemplo, naftaleno, antraceno, fenantreno, acridina y así sucesivamente.

Uno de los metales mencionados anteriormente está coordinado con uno o más agentes quelantes, cuyos ejemplos de partículas incluyen, por ejemplo, 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftaleno (NHA), 4,4'-bis(2",3",3"-heptafluoro-4",6"-hexano-dion-6"-il)-o--terfenilo (BHHT), 4,4'-bis(1,"1",1",2",2",3",3"-heptafluoro-4",6"-hexanodion-6"-il)-clorosulfo-o-terfenilo (BHHCT), compuestos relacionados con fenantrolina (fen) y fenantrolina (derivados de fenantrolina), tales como, por ejemplo, ácido carboxílico de fenantrolina, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (DPP) y similares, 3-(2-tienoilo, 1,1,1-trifluoroacetona (TTA), tiofenotrifluorobutanodiona (TTB), 3-naftoilo-1,1,1-trifluoroacetona (NPPTA), naftiltrifluorobutanodiona (NTA), óxido de fosfina de trioctilo (TOPO), óxido de fosfina de trifenilo (TPPO). El 3-benzoil-1,1,1-trifluoroacetona (BFTA), 2,2-dimetil-4-perfluorobutinoil-3-butanona (fod), 2,2'-dipiridilo (bpy), ácido salicílico, ácido bipyridilcarboxílico, éteres con corona aza, óxido de trioctilfosfina, criptandos aza y así sucesivamente, así como combinaciones de los anteriores. Tal como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones, el metal en el quelato metálico está al menos hexacoordinado. El quelato metálico estará sin cargar; por tanto, el número de grupos ácidos proporcionados por el agente quelante igualará el estado de oxidación del metal. Los ejemplos de quelatos metálicos particulares, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen $\text{Eu}(\text{BHHCT})_2\text{DPP}$, $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$, $\text{Eu}(\text{NTA})_3\text{DPP}$, $\text{Eu}(\text{NHA})_3\text{DPP}$, $\text{Eu}(\text{BHHT})_2\text{DPP}$ y los quelatos metálicos tratados en la patente estadounidense n.º 6.916.667 (por ejemplo, columnas 5-9) y en la solicitud de patente estadounidense n.º 20060270063 (columna 3-4).

Muchos de los agentes quelantes y quelatos metálicos se conocen en la técnica y muchos están disponibles en el mercado. En general, los quelatos metálicos pueden prepararse a partir de un agente quelante metálico mediante la combinación de un cloruro de metal con la relación deseada de moléculas de agente quelante metálico en un disolvente tamponado acuoso y una base suficiente para absorber el ácido clorhídrico que se produce durante la reacción. Por ejemplo, los quelatos metálicos pueden prepararse mediante un procedimiento, tal como, el descrito en Shinha, A. P., "Fluorescences and laser action in rare earth chelates," *Spectroscopy Inorganic Chemistry*, vol. 2, (1971), 255-288.

El reactivo quimioluminiscente puede incluir un grupo o funcionalidad que confiera hidrofiliidad o solubilidad en agua, lo que aumenta la humectabilidad de los sólidos con agua y la solubilidad en los sistemas acuosos de los compuestos a los que se enlaza. Una o más de tales funcionalidades pueden estar presentes en el compuesto olefínico o en el quelato metálico o ambos. Tal grupo funcional o funcionalidad puede ser un sustituto que tiene de 1 a 50 o más átomos y puede incluir un sulfonato, sulfato, fosfato, amidina, fosfonato, carboxilato, hidroxilo, particularmente, polioles, amina, éter, amida y similares. Los grupos funcionales ilustrativos son carboxialquilo, sulfonoxialquilo, $\text{CONHOCH}_2\text{COOH}$, $\text{CO}(\text{glucosamina})$, azúcares, dextrano, ciclodextrina, $\text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{COOH}$, SO_3H , $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, PO_3H_2 , OPO_3H_2 , hidroxilo, carboxilo, cetona y combinaciones de los mismos. Tal grupo o funcionalidad puede introducirse en el agente quelante mediante métodos que son bien conocidos en la técnica para la introducción de tales grupos o funcionalidades en los compuestos.

Después de la preparación del reactivo quimioluminiscente, el reactivo quimioluminiscente puede colocarse en un medio adecuado para su almacenamiento hasta usarse en un ensayo. En muchas realizaciones, el medio es un medio acuoso, normalmente un medio tamponado acuoso. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir del 0,1 a aproximadamente el 40 por ciento en volumen de un codisolvente, tal como, por ejemplo, un disolvente orgánico, que puede ser un alcohol, éter, éster, amina, amida y similares. El pH del medio normalmente estará en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 o en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5. Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINE y similares. El tampón particular empleado no es crítico, pero con un reactivo quimioluminiscente particular, se puede preferir un tampón u otro. En algunas realizaciones, el medio en el que se almacena el reactivo quimioluminiscente es sustancialmente similar al, o el mismo que, medio para un ensayo para un analito en el que el reactivo quimioluminiscente es uno de los reactivos de ensayo empleados. La solubilidad del reactivo quimioluminiscente en un medio acuoso a temperatura ambiente es, por ejemplo, de al menos el 50 %, o al menos el 55 %, o al menos el 60 %, o al menos el 65 %, o al menos el 70 %, o al menos el 75 %, o al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 % o al menos el 95 % (peso respecto a volumen).

En una realización específica de lo anterior, a modo de ilustración y no de limitación, el reactivo quimioluminiscente comprende un tioxeno y $\text{Eu}(\text{BHHCT})_2\text{DPP}$, ambos de estos se enlazan covalentemente a BSA, a la que también se enlaza una pareja de enlace para un analito.

Un elemento de un par de enlace específico ("elemento sbp") para su uso en las presentes realizaciones para la unión no covalente es una de dos moléculas diferentes, que tiene un área en la superficie o en una cavidad que se enlaza específicamente con y se define, de este modo, como complementario con una organización polar y espacial particular de la otra molécula. El par de enlace específico para su uso en las presentes realizaciones se selecciona entre el grupo que consiste en (i) una molécula pequeña y una pareja de enlace para la molécula pequeña y (ii) una molécula grande y una pareja de enlace para la molécula grande. En algunas realizaciones, la molécula pequeña tiene un peso molecular menor de aproximadamente 2.000, o menor de aproximadamente 1.500, o menor de aproximadamente 1.000, o menor de aproximadamente 500, o menor de aproximadamente 400, o menor de aproximadamente 300 o similares. Los ejemplos de pareja de enlace a molécula pequeña para los pares de molécula pequeña, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen pareja de enlace a biotina para la biotina (por ejemplo, avidina, estreptavidina, anticuerpo para la biotina, etc.), pareja de enlace a digoxina para la digoxina (por ejemplo, anticuerpo para la digoxina, etc.), pareja de enlace a fluoresceína para la fluoresceína (anticuerpo para la fluoresceína, etc.), pareja de enlace a rodamina para la rodamina (por ejemplo, anticuerpo para la rodamina), pareja de enlace a péptido para el péptido (anticuerpo para el péptido, etc.), parejas de enlace específico a analito (por ejemplo, factor intrínseco para B12, factor de enlace de folato para el folato) y así sucesivamente.

En algunas realizaciones de un par de enlace específico para su uso en las presentes realizaciones, el peso molecular de la molécula grande es mayor de aproximadamente 2.000, o mayor de aproximadamente 5.000, o mayor de aproximadamente 10.000, o mayor de aproximadamente 50.000, o mayor de aproximadamente 100.000, o mayor de aproximadamente 500.000, o mayor de aproximadamente 1.000.000, o mayor de aproximadamente 5.000.000 o mayor de aproximadamente 10.000.000 o similares. Los ejemplos de pareja de enlace a molécula grande para los pares de molécula grande, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen elementos de un par inmunológico, tales como antígeno-anticuerpo, hormona-receptores de hormona, dupletes de ácido nucleico, IgG-proteína A, pares de polinucleótidos, tales como ADN-ADN, ADN-ARN, otros receptores y ligandos y similares.

La naturaleza del par de enlace para el analito depende principalmente de la naturaleza del analito. La pareja de enlace para el analito puede ser un anticuerpo, un polinucleótido, una proteína de enlace específico a analito diferente de un anticuerpo y así sucesivamente. Un anticuerpo es una inmunoglobulina que se enlaza específicamente con y se define, de este modo, como complementaria con una organización polar y espacial particular de otra molécula. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede prepararse mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica, tales como inmunización de un huésped y recogida de suero (policlonal) o mediante la preparación de líneas de células híbridas continuas y la recogida de la proteína segregada (monoclonal) o mediante la clonación y la expresión de secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para el enlace específico de anticuerpos naturales. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmentos de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de la misma pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab' y similares. Además, los agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos pueden usarse cuando sea necesario, siempre y cuando se mantenga la afinidad de enlace para una molécula particular.

Un analito puede ser un ligando, que es monovalente (monoepitópico) o polivalente (poliepitópico), normalmente antigénico o hapténico y es un compuesto individual o una pluralidad de compuestos que comparten al menos un sitio epitópico o determinante común. El analito puede ser una parte de una célula, tal como una bacteria o una célula que lleva un antígeno de grupo sanguíneo, tal como A, B, D, etc., o un antígeno de HLA o el analito puede ser un microorganismo, por ejemplo, bacteria, hongo, protozoo o virus.

Los analitos de ligando polivalente pueden ser poli(aminoácidos), es decir, polipéptidos y proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos. Tales combinaciones incluyen componentes de bacterias, virus, cromosomas, genes, mitocondrias, núcleos, membranas celulares y similares. En su mayoría, el ligando poliepitópico tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 5.000, más normalmente de al menos aproximadamente 10.000. En la categoría de poli(aminoácido), los poli(aminoácidos) de interés pueden ser de aproximadamente 5.000 a 5.000.000 de peso molecular, más normalmente de aproximadamente 20.000 a 1.000.000 de peso molecular; entre las hormonas de interés, los pesos moleculares variarán normalmente de aproximadamente 5.000 a 60.000 de peso molecular.

El analito puede ser una proteína, tal como, por ejemplo, inmunoglobulinas, citocinas, enzimas, hormonas, antígenos de cáncer, marcadores nutritivos, antígenos específicos de tejidos, etc. Tales proteínas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, protaminas, histonas, albúminas, globulinas, escleroproteínas, fosfoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, glucoproteínas, receptores de células T, proteoglicanos, HLA, proteínas sin clasificar, por ejemplo, somatotropina, prolactina, insulina, pepsina, proteínas encontradas en plasma humano, factores de coagulación sanguínea, hormonas de proteínas, tales como, por ejemplo, hormona estimulante de folículos, hormona luteinizante, luteotropina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormonas de tejidos, citocinas, antígenos de cáncer, tales como, por ejemplo, PSA, CEA, a-fetoproteína, fosfatasa ácida, CA19.9, CA15.3 y CA125, antígenos específicos de tejidos, tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina, mioglobina, CK-MB y calcitonina, y hormonas de péptidos. Otros analitos de interés son los mucopolisacáridos y los

polisacáridos.

Los analitos de ligando monoepitópico, en general, serán de aproximadamente 100 a 2.000 de peso molecular, más normalmente de aproximadamente 125 a aproximadamente 1.000 de peso molecular. Los analitos incluyen fármacos (por ejemplo, fármacos adictivos, fármacos terapéuticos, etc.), metabolitos, pesticidas, contaminantes y similares. Los fármacos adictivos representativos (incluyendo fármacos en desuso), a modo de ejemplo y no de limitación, incluyen (i) alcaloides, tales como alcaloides de morfina, que incluyen morfina, codeína, heroína, dextrometorfano, sus derivados y metabolitos; alcaloides de cocaína, que incluyen cocaína y ecgonina de bencilo, sus derivados y metabolitos; alcaloides de ergot, que incluyen dietilamida de ácido lisérgico; alcaloides esteroideos; 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 los estrógenos, andrógenos, esteroides androcorticales, ácidos biliares, agliconas y glucósidos cardiotónicos, que incluyen digoxina y digoxigenina, saponinas y sapogeninas, sus derivados y metabolitos; sustancias miméticas de esteroides, tales como dietilestilbestrol; (iii) lactamas que tienen de 5 a 6 elementos anulares, que incluyen los barbitúricos, por ejemplo, fenobarbitales y secobarbitales, difenilhidantoína, primidona, etosuximida y sus metabolitos; (iv) aminoalquilbencenos, con cadena de alquilo de 2 a 3 átomos de carbono, que incluyen las anfetaminas; catecolaminas, que incluyen efedrina, L-dopa, epinefrina; narceína; papaverina; y metabolitos de las anteriores; (v) benzoheterocíclicos que incluyen oxazepam, clorpromazina, tegretol, sus derivados y metabolitos, siendo los anillos heterocíclicos azepinas, diazepinas y fenotiazinas; (vi) purinas, que incluyen teofilina, cafeína, sus metabolitos y derivados; (vii) fármacos derivados de marihuana, que incluyen cannabinoles y tetrahidrocannabinol; (viii) hormonas, tales como tiroxina, cortisol, triyodotironina, testosterona, estradiol, estrona, progesterona, (ix) antidepresivos tricíclicos, que incluyen imipramina, desmetilimipramina, amitriptilina, nortriptilina, protriptilina, trimipramina, clomipramina, doxepina y desmetilidoxepina; y (x) antineoplásicos, que incluyen metotrexato; y similares.

Descripción general de los ensayos para un analito que utilizan los presentes reactivos

Las realizaciones de la presente divulgación tienen su aplicación en ensayos para la determinación de un analito. En general, en tales ensayos, los reactivos comprenden, entre otros, una pareja de enlace para el analito. Una muestra sospechosa de contener un analito se combina en un medio de ensayo con una pareja de enlace para el analito. Se realiza una determinación del grado de enlace entre el analito y la pareja de enlace para el analito. Un reactivo quimioluminiscente, de acuerdo con la presente divulgación, se emplea como reactivo marcador en la detección de este caso de enlace. El ensayo se puede realizar sin separación (homogéneo) o con separación (heterogéneo) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los ensayos heterogéneos normalmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos.

Algunos ensayos conocidos utilizan un sistema de producción de señales (sps) que emplea un reactivo quimioluminiscente particulado, que tiene un quelato metálico asociado a un soporte y tiene al menos un primer y segundo elementos de sps. La designación "primer" y "segundo" es completamente arbitraria y no pretende sugerir ningún orden o clasificación entre los elementos de sps ni ningún orden de adición de los elementos de sps en los presentes métodos. Los elementos de sps pueden estar relacionados por que la activación de un elemento del sps produce un producto, tal como, por ejemplo, luz, que da como resultado una activación de otro elemento del sps. En algunas realizaciones de ensayos conocidos, los elementos de sps comprenden un sensibilizador y una composición quimioluminiscente en los que la activación del sensibilizador da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. El segundo elemento de sps normalmente genera una señal detectable que se refiere a la cantidad de elemento de sps enlazado y/o no enlazado, es decir, la cantidad de elemento de sps enlazado o no enlazado al analito que se detecta o a un agente que refleja la cantidad del analito a detectar. De acuerdo con la presente divulgación, el reactivo quimioluminiscente no particulado, de acuerdo con la presente divulgación y descrito anteriormente, puede emplearse en lugar del reactivo quimioluminiscente particulado de los métodos conocidos.

En algunas realizaciones de métodos de acuerdo con la presente divulgación, el primer elemento de sps es un sensibilizador, tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador, y el segundo elemento de sps es el reactivo quimioluminiscente no particulado de la presente divulgación que se activa como resultado de la activación del primer elemento de sps. El sensibilizador puede ser cualquier resto que, con la activación, produzca un producto que active el reactivo quimioluminiscente, que, a su vez, genere una señal detectable. En muchas realizaciones, el sensibilizador es capaz de generar oxígeno de singlete con la activación.

En algunas realizaciones, el sensibilizador es un fotosensibilizador para la generación de oxígeno de singlete normalmente mediante excitación con luz. El fotosensibilizador puede ser fotoactivable (por ejemplo, colorantes y compuestos aromáticos) o quimioactivados (por ejemplo, enzimas y sales metálicas). Cuando se excita mediante luz, el fotosensibilizador normalmente es un compuesto formado de átomos enlazados covalentemente, normalmente con múltiples enlaces dobles o triples conjugados. El compuesto debe absorber luz en el intervalo de longitud de onda de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.100 nm, o de aproximadamente 300 a aproximadamente 1.000 nm, o de aproximadamente 450 a aproximadamente 950 nm, con un coeficiente de extinción en su absorbancia máxima mayor de aproximadamente $500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o de al menos aproximadamente

5.000 M⁻¹ cm⁻¹, o de al menos aproximadamente 50.000 M⁻¹ cm⁻¹ en la longitud de onda de excitación. Los fotosensibilizadores que deben excitarse mediante luz serán relativamente fotoestables y no reaccionarán eficazmente con el oxígeno de singlete. Varias características estructurales están presentes en la mayoría de los fotosensibilizadores útiles. La mayoría de los fotosensibilizadores tienen al menos uno y frecuentemente tres o más
5 enlaces dobles o triples conjugados mantenidos en una estructura rígida, frecuentemente aromática. El fotosensibilizador normalmente contiene al menos un grupo que acelera el cruce entre sistemas, tal como un grupo carbonilo o imina, o un átomo pesado seleccionado entre las filas 3-6 de la tabla periódica, especialmente yoduro o bromuro, o estos pueden tener estructuras aromáticas prolongadas. Los fotosensibilizadores típicos incluyen acetona, benzofenona, 9-tioxantona, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metalo-porfirinas, tales como
10 hematoporfirina, ftalocianinas, clorofilas, rosa de bengala, buckminsterfullereno, etc. y derivados de estos compuestos que tienen sustitutos de 1 a 50 átomos para hacer que tales compuestos sean más lipófilos o más hidrófilos y/o como grupos de unión para la unión, por ejemplo, a un elemento de sps o un elemento de sbp.

Los fotosensibilizadores útiles en los métodos anteriores incluyen otras sustancias y composiciones que pueden producir oxígeno de singlete con o, menos preferentemente, sin activación mediante una fuente de luz externa. Por
15 tanto, por ejemplo, se ha mostrado que las sales de molibdato y la cloroperoxidasa y la mieloperoxidasa más los iones de bromuro o cloruro (Kanofsky, J. Biol. Chem. (1983) 259 5596) catalizan la conversión del peróxido de hidrógeno al oxígeno de singlete y agua. También se incluyen dentro del alcance de los fotosensibilizadores los compuestos que no son verdaderos sensibilizadores, pero que, con la excitación mediante calor, luz o activación química, liberará una molécula de oxígeno de singlete. Los mejores elementos conocidos de esta clase de
20 compuestos incluyen los endoperóxidos, tales como endoperóxido de 1,4-biscarboxietil-1,4-naftaleno, 9,10-difenilntraceno-9,10-endoperóxido y 5,6,11,12-tetrafenil naftaleno 5,12-endoperóxido. El calentamiento o la absorción directa de luz por estos compuestos libera oxígeno de singlete. Los ejemplos de otros fotosensibilizadores que pueden utilizarse son aquellos expuestos en las patentes estadounidenses n.º 5.340.716 y 6.251.581.

En una realización particular, la presente invención tiene aplicación en el inmunoensayo de luminiscencia inducida al que se hace referencia en la patente estadounidense n.º 5.340.716 (Ullman) titulada "Assay Method Utilizing
25 Photoactivated Chemiluminescent Label" ("ensayo de luminiscencia inducida"). En un enfoque de acuerdo con la presente divulgación, el ensayo usa una partícula que incorpora un fotosensibilizador y un reactivo quimioluminiscente no particulado, tal como se ha descrito anteriormente. La pareja de enlace para un analito del presente reactivo quimioluminiscente se enlaza con un analito para formar un complejo o se enlaza a un segundo
30 elemento de sbp para formar un complejo, en relación con la presencia del analito. Si el analito está presente, el fotosensibilizador y el compuesto quimioluminiscente entran en estrecha proximidad en virtud del enlace, al analito, de la pareja de enlace para el analito en la partícula de fotosensibilizador y la pareja de enlace para el analito que es parte del reactivo quimioluminiscente no particulado de acuerdo con la presente divulgación. El fotosensibilizador genera oxígeno de singlete y activa el reactivo quimioluminiscente no particulado cuando los dos marcadores están
35 en estrecha proximidad. El reactivo quimioluminiscente activado produce posteriormente luz. La cantidad de luz producida se refiere a la cantidad del complejo formado, que, a su vez, se refiere a la cantidad de analito presente.

En algunas realizaciones del ensayo de luminiscencia inducida, se emplea una partícula de fotosensibilizador que se conjuga para la avidina. También se emplea una pareja de enlace biotinilada para un analito. Un reactivo quimioluminiscente no particulado, de acuerdo con la presente divulgación, se emplea como parte del sistema de
40 detección. El medio de reacción se incubaba para permitir que las partículas de fotosensibilizador se enlacen con la pareja de enlace biotinilada para el analito en virtud del enlace entre la avidina y la biotina y también para permitir que se enlacen la pareja de enlace para el analito que es parte del reactivo de fotosensibilizador y la pareja de enlace para el analito que es parte del reactivo quimioluminiscente no particulado de acuerdo con la presente divulgación al analito. A continuación, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que es capaz, en
45 su estado excitado, de activar el oxígeno hasta un estado de singlete. Debido a que el reactivo quimioluminiscente está ahora en estrecha proximidad al fotosensibilizador en virtud de la presencia del analito, este está activado por el oxígeno de singlete y emite luminiscencia. A continuación, el medio se examina en cuanto a la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, refiriéndose la presencia de la misma a la presencia y/o cantidad del analito.

La muestra a analizar es una que es sospechosa de contener un analito. Las muestras son preferentemente de
50 seres humanos o animales e incluyen fluidos biológicos, tales como sangre entera, suero, plasma, esputo, fluido linfático, semen, moco vaginal, heces, orina, fluido espinal, saliva, deposiciones, fluido cefalorraquídeo, lágrimas, mocos y similares; tejidos biológicos, tales como cabello, piel, secciones o tejidos extirpados de órganos u otras partes del cuerpo; y así sucesivamente. En muchos casos, la muestra es sangre entera, plasma o suero.

La muestra puede prepararse en cualquier medio conveniente. De manera conveniente, la muestra puede prepararse en un medio de ensayo, que se trata más detalladamente en el presente documento. En algunos casos, puede aplicarse un pretratamiento a la muestra, tal como, por ejemplo, para lizar glóbulos rojos y similares. Tal pretratamiento normalmente se realiza en un medio que no interfiere posteriormente con un ensayo. Para el
55 tratamiento se prefiere un medio acuoso.

Tal como anteriormente se ha discutido brevemente, los ensayos se llevan a cabo normalmente en un medio tamponado acuoso a un pH moderado, que, en general, proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir del 0,1 a aproximadamente el 40 por ciento en volumen de un codisolvente. El pH para el medio normalmente estará en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, más normalmente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 y preferentemente en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5. El pH normalmente será un compromiso entre el enlace óptimo de los elementos de enlace de cualquier par de enlace específico, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, tales como los elementos del sistema de producción de señales, y así sucesivamente. Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINE y similares. El tampón particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual se puede preferir un tampón u otro.

Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en los métodos anteriores. Por ejemplo, además de los tampones, el medio puede comprender estabilizantes para el medio y para los reactivos empleados. En algunas realizaciones, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; disolventes orgánicos, tales como formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones, tales como sulfato de dextrano; potenciadores de enlace, por ejemplo, polialquilenglicoles; polisacáridos, tales como dextrano, trehalosa o similares. El medio también puede comprender agentes para la prevención de la formación de coágulos de sangre. Tales agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, EDTA, EGTA, citrato, heparina y similares. El medio también puede comprender uno o más conservantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, azida de sodio, sulfato de neomicina, PROCLIN® 300, estreptomina y similares. Cualquiera de los materiales anteriores, si se emplean, está presente en una concentración o cantidad suficiente como para lograr el efecto o función deseados.

Pueden aplicarse uno o más períodos de incubación al medio a uno o más intervalos que incluyen cualquier intervalo entre las adiciones de diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio normalmente se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca el enlace de diversos componentes de los reactivos. Las temperaturas moderadas se emplean normalmente para llevar a cabo el método y normalmente la temperatura constante, preferentemente, la temperatura ambiente, durante el período de la medición. Las temperaturas de incubación varían normalmente de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 99 °C, normalmente de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 70 °C, más normalmente de 20 °C a aproximadamente 45 °C. El período de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora o de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de enlace de diversos reactivos, que se determina mediante la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de enlace y la constante de velocidad de disociación. Las temperaturas durante las mediciones, en general, variarán de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 °C o de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 °C.

La concentración del analito que puede someterse a ensayo, en general, varía de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-17} M, más normalmente de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-14} M. Las consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicualitativo o cuantitativo (con respecto a la cantidad del analito presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración del analito normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo, en general, se determinarán mediante el intervalo de concentración de interés del analito, la naturaleza del ensayo y similares. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo durante el intervalo. Es decir, una variación en la concentración del analito que es de significancia debe proporcionar una diferencia de señal medible con precisión. Las consideraciones, tales como la naturaleza del sistema de producción de señales y la naturaleza de los analitos, normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la muestra y los reactivos se proporcionan en combinación en el medio. Aunque el orden de adición al medio puede variar, existirán determinadas preferencias para algunas realizaciones de los formatos de ensayo descritos en el presente documento. El orden de adición más sencillo, por supuesto, es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que tiene el medio de ensayo sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Como alternativa, cada uno de los reactivos, o grupos de reactivos, puede combinarse secuencialmente. En algunas realizaciones, puede estar implicada una etapa de incubación después de cada adición, tal como se ha tratado anteriormente.

Tal como se ha mencionado anteriormente, las realizaciones de los ensayos mencionados anteriormente emplean un reactivo de fotosensibilizador particulado. La partícula puede estar formada de un material orgánico o inorgánico, sólido o fluido, insoluble en agua, que puede ser transparente o parcialmente transparente. Las partículas tienen, en general, un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0,02 micrómetros y de no más de aproximadamente 100 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0,05

micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros o de aproximadamente 0,3 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferentemente de una densidad que se aproxima al agua, en general, de aproximadamente 0,7 g/ml a aproximadamente 1,5 g/ml y puede estar formada de un material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos, tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, estafilococo áureo, *E. coli*, virus y similares. Las partículas también pueden ser partículas formadas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, partículas magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones, lipoproteínas y similares. En algunas realizaciones, las partículas son partículas de cromo o partículas de látex.

10 Etapas de examinación

En una etapa siguiente de un método de ensayo, se examina el método en cuanto a la presencia de un complejo que comprende el analito y la pareja de enlace para el analito. La presencia y/o la cantidad del complejo indica la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.

15 La frase "medición de la cantidad de un analito" se refiere a la determinación cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa del analito. Los métodos que son cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, así como otros métodos para la determinación del analito, se consideran métodos de medición de la cantidad del analito. Por ejemplo, un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito en una muestra sospechosa de contener el analito, se considera incluido dentro del alcance de la presente divulgación. Los términos "detección" y "determinación", así como otros sinónimos comunes para la medición, se contemplan dentro del alcance de la presente divulgación.

20 En muchas realizaciones, la examinación del medio implica la detección de una señal de un medio en el que la señal producida resulta de la implicación de la composición quimioluminiscente de acuerdo con la presente divulgación. La presencia y/o la cantidad de la señal se refiere a la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra. El modo de detección particular depende de la naturaleza del sps. Tal como se ha tratado anteriormente, existen numerosos métodos mediante los que un marcador de un sps puede producir una señal detectable mediante medios externos. La activación de un sistema de producción de señales depende de la naturaleza de los elementos del sistema de producción de señales. En cuanto al elemento de sps que es un sensibilizador que se activa mediante luz, el elemento de sps se irradia con luz. Se sugerirán otros métodos de activación para aquellos expertos en la materia a la vista de las divulgaciones en el presente documento.

30 Cuando se usa un fotosensibilizador, el fotosensibilizador sirve para activar el reactivo quimioluminiscente cuando se irradia el medio que contiene los reactivos anteriores. El medio se irradia con una luz que tiene una longitud de onda de energía suficiente como para convertir el fotosensibilizador en un estado excitado y hacer que sea capaz de activar el oxígeno molecular a oxígeno de singlete. Cuando se enlaza a una pareja de enlace para el analito, la concentración del fotosensibilizador puede ser muy baja, frecuentemente de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-12} M o más baja. En general, en cuanto a las realizaciones anteriores que implican un fotosensibilizador, el medio se irradia con una luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 300 a aproximadamente 1.200 nm, o de aproximadamente 450 a aproximadamente 950 nm o de aproximadamente 550 a aproximadamente 800 nm.

40 El período de irradiación dependerá del tiempo de vida de la composición quimioluminiscente activada de las realizaciones de los presentes reactivos quimioluminiscentes y la intensidad de luz y la intensidad de emisión deseada. En cuanto a las composiciones quimioluminiscentes activadas de vida corta, el período puede ser menor de un segundo, normalmente de aproximadamente un milisegundo, pero puede ser tan corto como un microsegundo, en el que se usa una lámpara ultrarrápida o láser intensos. En cuanto a las composiciones quimioluminiscentes activadas de vida más larga, el período de irradiación puede ser más largo y puede usarse una fuente de luz fija menos intensa. En general, la intensidad de luz integrada durante el período de irradiación debe ser lo suficiente como para excitar al menos el 0,1 % de las moléculas de fotosensibilizador, preferentemente al menos el 30 %, y, lo más preferentemente, cada molécula de fotosensibilizador se excitará al menos una vez.

50 Un láser de helio-neón es una fuente de luz barata para la excitación a 632,6 nm. Los fotosensibilizadores que absorben luz a esta longitud de onda son compatibles con la línea de emisión de un láser de helio-neón y son, por lo tanto, particularmente útiles en los presentes métodos en los que se emplean fotosensibilizadores. Otras fuentes de luz incluyen, por ejemplo, otros láseres, tales como argón, YAG, He/Cd y rubí; fotodiodos; lámparas de vapor de mercurio, sodio y xenón; lámparas incandescentes, tales como tungsteno y tungsteno/halógeno; y lámparas ultrarrápidas.

55 Las temperaturas durante las mediciones, en general, varían de aproximadamente 10 ° a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 20 ° a aproximadamente 45 °C o de aproximadamente 20 ° a aproximadamente a aproximadamente 25 °C. En un enfoque, las curvas convencionales se forman usando concentraciones conocidas de los analitos a explorar. Tal como se ha tratado anteriormente, también pueden usarse los calibradores y otros

controles.

- La luminiscencia o luz producidas en cualquiera de los enfoques anteriores puede medirse visualmente, fotográficamente, actinométricamente, espectrofotométricamente o mediante cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad de las mismas, que se refiere a la cantidad de analito en el medio. La examinación de la presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que es, en general, simplemente una etapa en la que se lee la señal. La señal se lee normalmente 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 similares. La presencia y la cantidad de señal detectadas se refiere a la presencia y la cantidad del analito presente en una muestra.
- 10 Un láser de helio-neón es una fuente de luz barata para la excitación a 632,6 nm. Los fotosensibilizadores que absorben luz a esta longitud de onda son compatibles con la línea de emisión de un láser de helio-neón y son, por lo tanto, particularmente útiles en los presentes métodos en los que se emplean fotosensibilizadores. Otras fuentes de luz incluyen, por ejemplo, otros láseres, tales como argón, YAG, He/Cd y rubí; fotodiodos; lámparas de vapor de mercurio, sodio y xenón; lámparas incandescentes, tales como tungsteno y tungsteno/halógeno; y lámparas ultrarrápidas.

Kits que comprenden reactivos para llevar a cabo los ensayos

- El reactivo quimioluminiscente y otros reactivos presentes para llevar a cabo un ensayo particular pueden estar presentes en un kit útil para realizar de manera conveniente un ensayo para la determinación de un analito. En algunas realizaciones, un kit comprende, en combinación empaquetada, una pareja de enlace para la biotina para el conjugado de analito, partículas de sensibilizador de estreptavidina y un reactivo quimioluminiscente no particulado de acuerdo con la presente divulgación, en el que la pareja de enlace para el analito del reactivo quimioluminiscente reconoce y se enlaza con un epítopo diferente en el analito de la pareja de enlace para el analito que es parte de la pareja de enlace para la biotina para el conjugado de analito. El kit puede incluir además otros reactivos para realizar el ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular.
- 25 Los reactivos pueden estar, cada uno, en recipientes separados o diversos reactivos pueden combinarse en uno o más recipientes, en función de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos empaquetados por separado para llevar a cabo un ensayo, tales como los elementos de sbp adicionales, reactivos auxiliares y así sucesivamente.
- 30 Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que necesitan producirse durante el presente método y, además, optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En circunstancias adecuadas, pueden proporcionarse uno o más de los reactivos en el kit como polvo seco, normalmente liofilizado, incluyendo excipientes, que, al disolverse, proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones adecuadas para realizar un método o ensayo de acuerdo con la presente divulgación. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método de acuerdo con la presente divulgación, tal como se ha descrito anteriormente.
- 35 La frase "al menos", tal como se usa en el presente documento, significa que el número de elementos especificados puede ser igual a o mayor que el número citado. La frase "aproximadamente", tal como se usa en el presente documento, significa que el número citado puede diferir en más o menos el 10 %; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un intervalo de 4,5 a 5,5. Las designaciones "primer" y "segundo" se usan únicamente para el fin de diferenciar entre dos elementos, tales como, por ejemplo, "primer elemento de sps" y "segundo elemento de sps", y no pretenden implicar ninguna secuencia u orden o importancia para un elemento sobre otro.

Ejemplos

Materiales:

- 45 El ensayo se llevó a cabo usando el analizador DIMENSION® RxL, disponible a través de Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE. Se empleó el instrumento usando la tecnología de inmunoensayos de luminiscencia inducida y se equipó con un lector adecuado.

- A menos que se indique lo contrario, los reactivos se adquirieron a través de Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI) y se usaron como se recibieron, a menos que mencione lo contrario. El BHHCT se sintetizó tal como ha descrito Yuan J. y Matsumoto K. (Anal. Biochem. 1998, 70: 596-601). El anticuerpo anti-TSH, un anticuerpo monoclonal, se preparó mediante técnicas de hibridación de células somáticas; véase, por ejemplo, Köhler y Milstein, Nature 265:495-497, 1975.

La pureza de las muestras se analizó mediante una cromatografía de capa fina (TLC) analítica realizada en placas con respaldo de vidrio de gel de sílice GF de Analtech Uniplate (0,25 mm) usando el disolvente especificado. Los puntos de la TLC se visualizaron mediante luz ultravioleta (longitud de onda corta y/o larga) y/o vapores de yodo. Se llevó a cabo una cromatografía en columna ultrarrápida usando gel de sílice de Whatman de 60 Å (malla 230-400).

5 Los espectros de RMN ¹H se registraron en un espectrómetro Bruker Ultrashiel™-400 (400 MHz). Los desplazamientos químicos se indican en partes por millón (ppm, δ) con respecto al tetrametilsilano como referencia interna. Las abreviaturas de RMN usadas son s (singlete), d (doblete), m (multiplete) y t (triplete).

10 Preparación del Compuesto II (Figura 1): Se añadieron anilina de n-metilo (I) (25 g, 233,3 mmol) y 5-bromo-valerato de etilo (25 g, 119,6 mmol) en un matraz de fondo redondo de 100 ml. El contenido del matraz se calentó con agitación a 100 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se vertió en acetato de etilo (50 ml). La solución de acetato de etilo se lavó con el 20 % de hidróxido de sodio (3 x 50 ml); la solución de hidróxido de sodio combinada se extrajo de nuevo una vez con acetato de etilo (25 ml) y la solución acuosa de hidróxido de sodio restante se desechó. El extracto de acetato de etilo combinado se lavó con agua (10 ml) y se secó sobre MgSO₄. La solución de acetato de etilo transparente se concentró hasta secarse en un evaporador giratorio. El aceite residual así obtenido se purificó mediante destilación a alto vacío (130-134 °C, 0,5 mm de Hg) para producir 21 g de un Compuesto II líquido incoloro. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,18 (m, 2H), 6,68 (m, 3 H), 4,2 (c, J = 8,0 Hz, 2H), 3,36 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 2,92 (s, 3H), 2,33 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 1,64 (m, 4H), 1,24 (t, J = 8,0 Hz, 3H).

20 Preparación del Compuesto III (Figura 1): Se añadió oxiclórico de fósforo (POCl₃; 5 g, 33 mmol) gota a gota durante un período de 10 minutos, a través de un embudo de goteo, a formamida de N,N-dimetilo (DMF; 8,8 g, 120 mmol) agitada a 0-4 °C. Después de 10 minutos a 0-4 °C, se añadió rápidamente el Compuesto II (3,7 g, 15,96 mmol) en una porción. El vial usado para el Compuesto II se aclaró con 1 ml de DMF y la solución de DMF se añadió a la mezcla de reacción agitada, que se calentó con agitación a 100 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se vertió lentamente en una mezcla de agua con hielo. La fase acuosa se neutralizó con el 20 % de hidróxido de sodio y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). La solución de acetato de etilo combinada se lavó con agua (20 ml) y se secó sobre MgSO₄. La solución orgánica se concentró hasta secarse a presión reducida. El residuo oleoso resultante se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/diclorometano (9/1; v/v) para dar 2,46 g del Compuesto III. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 9,72 (s, 1H), 7,18 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 6,68 (d, J = 8,0 Hz, 2 H), 4,22 (c, J = 8,0 Hz, 2H), 3,40 (m, 2H), 3,05 (s, 3H), 2,35 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 1,65 (m, 4H), 1,25 (t, J = 8,0 Hz, 3H).

35 Preparación del Compuesto IV (Figura 1): Se añadió cianuro de potasio (1,0 g, 15,3 mmol) a una solución del Compuesto III (2,46 g, 9,34 mmol) en 15 ml del 60 % de etanol agitada en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se calentó a reflujo durante 15 minutos. El benzaldehído (1,05 g) disuelto en 10 ml de etanol se añadió a la mezcla de reacción a reflujo durante un período de 45 minutos. Después de 15 minutos, la mezcla de reacción enfriada se vertió en acetato de etilo (30 ml). La fase acuosa se separó y se extrajo de nuevo con acetato de etilo (3 x 30 ml). La solución de acetato de etilo combinada se secó sobre MgSO₄ y la solución transparente se concentró hasta secarse a presión reducida. La mezcla de reacción en bruto se disolvió en 10 ml de etanol seco, se mezcló con 0,25 ml de cloruro de trimetilsililo y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en una mezcla de bicarbonato de sodio saturado (120 ml) y diclorometano (30 ml). La fase acuosa se separó y se extrajo con diclorometano (2 x 30 ml). La fase orgánica combinada se lavó con bicarbonato de sodio saturado (60 ml) y se secó sobre MgSO₄. La solución orgánica se concentró hasta secarse a presión reducida. El residuo oleoso resultante se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (1/5; v/v) para dar 196 mg del Compuesto IV. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,84 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,34 (m, 5H), 6,54 (d, J = 8 Hz, 2H), 5,86 (d, J = 4 Hz, 1H), 4,86 (d, J = 4 Hz, 1H), 4,14 (c, J = 8,0 Hz, 2H), 3,38 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 3,00 (s, 3H), 2,34 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 1,64 (m, 4H), 1,25 (t, J = 8,0 Hz, 3H).

50 Preparación del Compuesto V (Figura 1): Una solución agitada del Compuesto IV (176 mg, 0,476 mmol) en 8 ml de tolueno seco se mezcló con tioetanol (0,28 ml, 312 mg, 4,0 mmol) y cloruro de trimetilsililo (0,51 ml, 436 mg, 4,0 mmol). Después del calentamiento a reflujo durante 24 h, en nitrógeno, la mezcla de reacción enfriada se vertió en bicarbonato de sodio saturado (15 ml). La fase orgánica se separó y se lavó con bicarbonato de sodio saturado (10 ml). La fase acuosa combinada se extrajo de nuevo con diclorometano (3 x 30 ml) y el extracto de diclorometano se lavó con agua (20 ml). La solución de diclorometano combinada se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró hasta secarse. El residuo oleoso se purificó mediante cromatografía de capa fina preparativa usando acetato de etilo/diclorometano (5/95; v/v) para dar 93 mg del Compuesto V. RMN ¹H (CDCl₃) δ: 7,20-7,04 (m, 7H), 6,50 (d, J = 8,0 Hz, 2 H), 4,48 (m, 2H), 4,12 (c, J = 8,0 Hz, 2H), 3,28 (m, 2H), 3,20 (m, 2H), 2,87 (s, 3H), 2,32 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,25 (t, J = 8,0 Hz, 3H).

60 Preparación del Compuesto VI (Figura 1): Se añadió hidróxido de sodio (30 mg, 0,75 mmol) a una solución agitada del Compuesto V (28 mg, 0,068 mmol) en MeOH (1 ml)-THF (2 ml)-agua (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h cuando el análisis de TLC mostró la ausencia de cualquier producto de partida. La mezcla de reacción se mezcló con 1,5 ml de agua y el pH se ajustó a 3,0 mediante una adición lenta de HCL 1 N. La mezcla de reacción se evaporó hasta secarse al vacío. El residuo oleoso se disolvió en diclorometano (50 ml) y se

lavó con 10 ml de agua. La solución orgánica transparente se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró hasta secarse para dar 23,6 mg del Compuesto VI. FAB-MS (modo negativo) m/z: 382 [(M-H)⁻; 100]; RMN ¹H (CD₃OD) δ: 7,15-7,09 (m, 7H), 6,81 (d, J = 8,0 Hz, 2 H), 4,47 (m, 2H), 3,35 (m, 2H), 3,22 (m, 2H), 2,97 (s, 3H), 2,31 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 1,58 (m, 4H).

5 Síntesis de carboxilato de tioxeno acoplado a BSA: El carboxilato de tioxeno VI (12,2 mg; 32 mmol) se disolvió en 0,5 ml de DMF. La mezcla se mezcló con una solución de DMF de 0,1 ml de N-hidroxisuccinimida (NHS) (16 mg; 140 mmol) y una solución de DMF de 0,1 ml de carbodiimida de dicitohexilo (16 mg; 79 mmol). Después de la agitación durante 16 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción orgánica se añadió lentamente a una solución de 5 ml de albúmina de suero bovino (BSA) (55 mg; 0,82 mmol) en fosfato de sodio 100 mM-cloruro de europio 0,2 mM, a pH 7,60. Después de 4 h, el sólido precipitado se separó mediante centrifugación y se desechó. La solución transparente se hizo pasar a través de una columna Sephadex G25 (2,6 x 30 cm) equilibrada y eluida con bicarbonato de sodio 100 mM-cloruro de europio 0,2 mM, a pH 8,20. Las fracciones que contenían proteínas se combinaron. El BSA-tioxeno, obtenido de este modo, se calculó que incorporaba 31 residuos de tioxeno por mol de la proteína utilizando un coeficiente de extinción de $1,33 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 330 nm.

15 Preparación de BSA-tioxeno activado: Una solución de 12 ml de BSA-tioxeno (2 mg/ml de proteína; 0,36 mmol) se mezcló con 1,2 ml de una solución de 10 mg/ml de sulfosMPB ([4-[-maleimidofenil]butirato] de sulfosuccinimidilo); 26,2 mmol). Después de 3 h a temperatura ambiente, la solución de proteína se separó del exceso de reactivos mediante su paso a través de una columna Sephadex G25 (2,6x30 cm) equilibrada y eluida con fosfato de sodio 100 mM-cloruro de europio 200 μM, a pH 6,0.

20 Preparación de IgG-BSA-tioxeno: El acoplamiento del BSA-tioxeno activado de lo anterior con anticuerpo reducido se llevó a cabo mediante la mezcla de una solución de 3,0 ml de anticuerpo anti-TSH (denominado "IgG" en el conjugado anterior) con 0,33 ml de una solución 100 mM de ditiotreitol en fosfato de sodio 100 mM-EDTA 5,0 mM, a pH 6,0. Después del calentamiento a 37 °C durante una hora, la solución de proteína se hizo pasar a través de una columna Sephadex G25 (1,6x30 cm) equilibrada y eluida con fosfato de sodio 100 mM-cloruro de europio 200 μM, a pH 6,0. El anticuerpo reducido se calculó que contenía 7,2 mol de sulfhidrilos libres por mol de la proteína. Una solución de 7,3 ml de este anticuerpo reducido que contenía 19 mg de proteína (136 μmol) se mezcló con 28 ml de BSA-tioxeno activado que contenía 31 mg de proteína (463 μmol) y la mezcla de reacción se concentró hasta 3 ml, después de ajustar el pH a 7,0. Después de 16 h a 4 °C, la mezcla de reacción se inactivó con 50 μl de una solución acuosa de 20 mg/ml de N-etilmaleimida. La solución de proteína se purificó después mediante filtración en gel sobre una columna AcA-34 (1,6x70 cm) equilibrada y eluida con Hepes 50 mM-NaCl 300 mM-0,2 % de polietilenglicol (PEG8000)-cloruro de europio 0,2 mM, a pH 8,0. Las fracciones, que corresponden al primer pico de proteína eluido de la columna, se agruparon y se almacenaron en presencia de 0,25 mg/ml de sulfato de neomicina.

35 Reacción de IgG-BSA-tioxeno con BHHCT: Una solución de 5 ml del IgG-BSA-tioxeno de lo anterior, que contenía aproximadamente 1 mg/ml de proteína, se mezcló con una solución de DMF de 0,5 ml de BHHCT que contenía 4,5 mg de BHHCT. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min y la solución transparente se hizo pasar a través de una columna Sephadex G50 (2,6x30 cm) equilibrada y eluida con Hepes 50 mM-NaCl 300 mM-0,2 % de polietilenglicol (PEG8000)-cloruro de europio 0,2 mM, a pH 8,0. Las fracciones que contenían proteína se agruparon y se almacenaron en presencia de 0,25 mg/ml de sulfato de neomicina para dar IgG-BSA-(tioxeno)(BHHCT).

40 Ensayo que utiliza IgG-BSA-(tioxeno)(BHHCT): El IgG-BSA-(tioxeno)-(BHHCT) de lo anterior se diluyó a 1:100 en un tampón de HEPES 50 mM que contenía el 0,2 % de PEG8000, 2 mg/ml de BSA, EuCl_3 50 μM, DPP 1, 0,15 % de PROCLIN300® y 0,2 mg/ml de sulfato e neomicina. De esta manera, el BHHCT del reactivo anterior formó $\text{Eu}(\text{BHHCT})_2\text{DPP}$ *in situ*. El contenido de los pocillos 5-8 de un FLEX® de TSH de Dimension Vista® (n.º de cat K6412, lote 06229AB) se retiró y los pocillos se aclararon con agua desionizada y se recargaron con el reactivo diluido (IgG-BSA-(tioxeno)-(Eu(BHHCT)₂DPP) de lo anterior. Los pocillos que contenían anticuerpo anti-TSH biotinilado (R1, pocillos 1-4) y las perlas sensibilizadoras de estreptavidina (perlas de fotosensibilizador) (R3, pocillos 9-12) se dejaron intactos. El calibrador LOCI® 1 de 6 niveles (n.º de cat KC660, lote 6BD036) se ensayó en un VISTA® usando este FLEX® y los parámetros de método de TSH de VISTA® (soporte lógico 2.0 de VISTA®). La curva de calibración se muestra en la Figura 2, en la que krecuentos es kilocuentos y TSH es hormona estimulante de la tiroides. La separación en la señal de LOCI® fue de 2,2 veces entre el nivel B y A y 101 veces entre el nivel F y A. El N = 3 % de CV en el recorrido varió del 1,1 % al 6,3 % para los calibradores B a F. Los resultados se muestran en la Figura 3.

55 El FLEX® con el 1:100 diluido (IgG-BSA-(tioxeno)-(Eu(BHHCT)₂DPP) se almacenó a 2-8 °C y se ensayó periódicamente usando el calibrador LOCI® 1. Durante un período de 16 días, la señal de LOCI® para todos los calibradores no de cero (B a F) fue el 10 % del valor del día 0. Los resultados se muestran en las Figuras 4 y 5.

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo quimioluminiscente para la determinación de la presencia y/o cantidad de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito, siendo el reactivo no particulado, soluble en un medio acuoso, y que comprende una pareja de enlace para el analito enlazada covalente o no covalentemente con una composición quimioluminiscente que comprende un compuesto olefínico y un quelato metálico en el que el compuesto olefínico es
- 5 - un derivado de carboxilo de tiofenos y en el que el metal del quelato metálico es
- europio, terbio, disprosio o samario y en el que
- 10 el quelato del quelato metálico es
- 4,4'-bis(1,"1",1",2",2",3",3"-heptafluoro-4",6"-hexanodion-6"-il)-clorosulfo-o-terfenilo.
2. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 1, en el que la pareja de enlace para el analito se enlaza covalentemente con la composición quimioluminiscente mediante un enlace o un grupo de unión.
3. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 2, en el que la pareja de enlace para el analito se enlaza covalentemente con la composición quimioluminiscente mediante un grupo de unión y en el que el grupo de unión comprende una macromolécula hidrófila.
- 15 4. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 3, en el que el compuesto olefínico y el quelato metálico se unen a la misma molécula del grupo de unión al que se enlaza covalentemente la pareja de enlace para el analito.
5. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 3, en el que el compuesto olefínico y el quelato metálico se unen a moléculas separadas del grupo de unión al que se enlaza covalentemente la pareja de enlace para el analito y en el que el grupo de unión puede ser el mismo o diferente.
- 20 6. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 3, en el que la macromolécula hidrófila se selecciona entre el grupo que consiste en polipéptidos, dendrímeros, policarboxilatos, poliaminas, polisulfhidrilos y polietilenglicoles.
7. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 1, en el que la pareja de enlace para el analito se enlaza no covalentemente con la composición quimioluminiscente mediante un par de enlace específico en el que un elemento del par de enlace específico se une a la pareja de enlace para el analito y el otro elemento del par de enlace específico se une a la composición quimioluminiscente mediante un grupo de unión o enlace.
- 25 8. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 7, en el que la pareja de enlace para el analito se enlaza no covalentemente a la composición quimioluminiscente mediante un par de enlace específico en el que un elemento del par de enlace específico se une a la pareja de enlace para el analito y el otro elemento del par de enlace específico se une a la composición quimioluminiscente mediante un grupo de unión en el que el grupo de unión es una proteína.
- 30 9. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 8, en el que el compuesto olefínico y el quelato metálico se unen a la misma molécula del grupo de unión al que se enlaza no covalentemente la pareja de enlace para el analito.
- 35 10. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 8, en el que el compuesto olefínico y el quelato metálico se unen a moléculas separadas del grupo de unión al que se enlaza no covalentemente la pareja de enlace para el analito y en el que el grupo de unión puede ser el mismo o diferente.
- 40 11. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 3, en el que la macromolécula hidrófila es una proteína.
12. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 7, en el que el par de enlace específico se selecciona entre el grupo que consiste en (i) una molécula pequeña y una pareja de enlace para la molécula pequeña y (ii) una molécula grande y una pareja de enlace para la molécula grande.

13. El reactivo quimioluminiscente según la reivindicación 1, en el que el metal es europeo.

14. Un método para la determinación de la presencia y/o cantidad de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito, comprendiendo el método:

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

5 (i) la muestra,

(ii) un reactivo quimioluminiscente en el que el reactivo es no particulado, soluble en un medio acuoso, y que comprende una pareja de enlace para el analito enlazada covalente o no covalentemente con una composición quimioluminiscente que comprende un compuesto olefínico y un quelato metálico en el que el compuesto olefínico se selecciona entre el grupo que consiste en

10 - tioxenos, dioxenos, éteres de enol, enaminas, 9-alkilidenxantanos, 9-alkiliden-N-alkilacridanos, éteres de arilvinilo, arilimidazoles y lucigenina y en el que

el metal del quelato metálico se selecciona entre el grupo que consiste en

- europeo, terbio, disprosio, samario, osmio y rutenio y en el que

el quelato del quelato metálico se selecciona entre el grupo que consiste en

15 - 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftaleno, 4,4'-bis(2",3",3"-heptafluoro-4",6"-hexano-dion-6"-il)-o--terfenilo, 4,4'-bis(1",1",1",2",2",3",3"-heptafluoro-4",6"-hexanodion-6"-il)-clorosulfo-o-terfenilo, fenantrolina, ácido carboxílico de fenantrolina, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina, 3-(2-tieno-il,1,1,1-trifluoroacetona, tiofentri fluorobutano-diona, 3-naftoil-1,1,1-trifluoroacetona, naftiltrifluorobutanodiona, óxido de fosfina de trioctilo, óxido de fosfina de trifenilo, 3-benzoil-1,1,1-trifluoroacetona, 2,2-dimetil-4-perfluorobutinoil-3-butanona, 2,2'-dipiridilo, ácido salicílico, ácido bipyridilcarboxílico, éteres con corona aza, óxido de triocitilfosfina y criptandos aza, y combinaciones de los mismos, y

20

(iii) un reactivo de sensibilizador capaz de generar oxígeno de singlete,

(b) someter la combinación a condiciones para el enlace del analito con el elemento de par de enlace específico para el analito, y

25 (c) activar el sensibilizador y detectar la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente, refiriéndose la cantidad de luminiscencia a la cantidad del analito en la muestra.

15. El método según la reivindicación 14, en el que la pareja de enlace para el analito se enlaza covalentemente con la composición quimioluminiscente mediante un grupo de unión y en el que el grupo de unión comprende una macromolécula hidrófila.

30 16. El método según la reivindicación 14, en el que la pareja de enlace para el analito se enlaza no covalentemente con la composición quimioluminiscente mediante un par de enlace específico en el que un elemento del par de enlace específico se une a la pareja de enlace para el analito y el otro elemento del par de enlace específico se une a la composición quimioluminiscente mediante un grupo de unión en el que el grupo de unión comprende una macromolécula hidrófila.

35 17. El método de la reivindicación 14, en el que una pareja de enlace para el analito se asocia al reactivo de sensibilizador y el reactivo de sensibilizador comprende una partícula.

40 18. El uso de un reactivo quimioluminiscente, en el que el reactivo es no particulado, soluble en un medio acuoso, y que comprende una pareja de enlace para el analito enlazada covalente o no covalentemente con una composición quimioluminiscente que comprende un compuesto olefínico y un quelato metálico en el que el compuesto olefínico se selecciona entre el grupo que consiste en

- tioxenos, dioxenos, éteres de enol, enaminas, 9-alkilidenxantanos, 9-alkiliden-N-alkilacridanos, éteres de aril vinilo, arilimidazoles y lucigenina y en el que

el metal del quelato metálico se selecciona entre el grupo que consiste en

- europio, terbio, disprosio, samario, osmio y rutenio y en el que

el quelato del quelato metálico se selecciona entre el grupo que consiste en

5 - 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftaleno, 4,4'-bis(2'',3'',3''-heptafluoro-4'',6''-hexano-dion-6''-il)-o--terfenilo, 4,4'-bis(1'',1'',2'',2'',3'',3''-heptafluoro-4'',6''-hexanodion-6''-il)-clorosulfo-o-terfenilo, fenantrolina, ácido carboxílico de fenantrolina, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina, 3-(2-tienoílo, 1,1,1-trifluoroacetona, tiofentri fluorobutano-diona, 3-naftoil-1,1,1-trifluoroacetona, naftiltrifluorobutanodiona, óxido de fosfina de trioctilo, óxido de fosfina de trifenilo, 3-benzoil-1,1,1-trifluoroacetona, 2,2-dimetil-4-perfluorobutinoil-3-butanona, 2,2'-dipiridilo, ácido salicílico, ácido bipyridilcarboxílico, éteres con corona aza, óxido de trioctilfosfina y criptandos aza, y combinaciones de los mismos

10 en un método de la reivindicación 14.

19. Un kit que comprende, en combinación empaquetada, una pareja de enlace para la biotina para un conjugado de analito, partículas de sensibilizador de estreptavidina y un reactivo quimioluminiscente no particulado en el que el reactivo es no particulado, soluble en un medio acuoso, y que comprende una pareja de enlace para el analito enlazada covalente o no covalentemente con una composición quimioluminiscente que comprende un compuesto olefínico y un quelato metálico en el que el compuesto olefínico se selecciona entre el grupo que consiste en

15 - tioxenos, dioxenos, éteres de enol, enaminas, 9-alkilidenxantanos, 9-alkiliden-N-alkilacridanos, éteres de aril vinilo, arilimidazoles y lucigenina y en el que

el metal del quelato metálico se selecciona entre el grupo que consiste en

- europio, terbio, disprosio, samario, osmio y rutenio y en el que

20 el quelato del quelato metálico se selecciona entre el grupo que consiste en

25 - 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftaleno, 4,4'-bis(2'',3'',3''-heptafluoro-4'',6''-hexano-dion-6''-il)-o--terfenilo, 4,4'-bis(1'',1'',2'',2'',3'',3''-heptafluoro-4'',6''-hexanodion-6''-il)-clorosulfo-o-terfenilo, fenantrolina, ácido carboxílico de fenantrolina, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina, 3-(2-tienoílo, 1,1,1-trifluoroacetona, tiofentri fluorobutano-diona, 3-naftoil-1,1,1-trifluoroacetona, naftiltrifluorobutanodiona, óxido de fosfina de trioctilo, óxido de fosfina de trifenilo, 3-benzoil-1,1,1-trifluoroacetona, 2,2-dimetil-4-perfluorobutinoil-3-butanona, 2,2'-dipiridilo, ácido salicílico, ácido bipyridilcarboxílico, éteres con corona aza, óxido de trioctilfosfina y criptandos aza, y combinaciones de los mismos,

en el que la pareja de enlace para el analito del reactivo quimioluminiscente reconoce y se enlaza con un epítipo diferente en el analito de la pareja de enlace para el analito que es parte de la pareja de enlace para la biotina para el conjugado de analito.

30

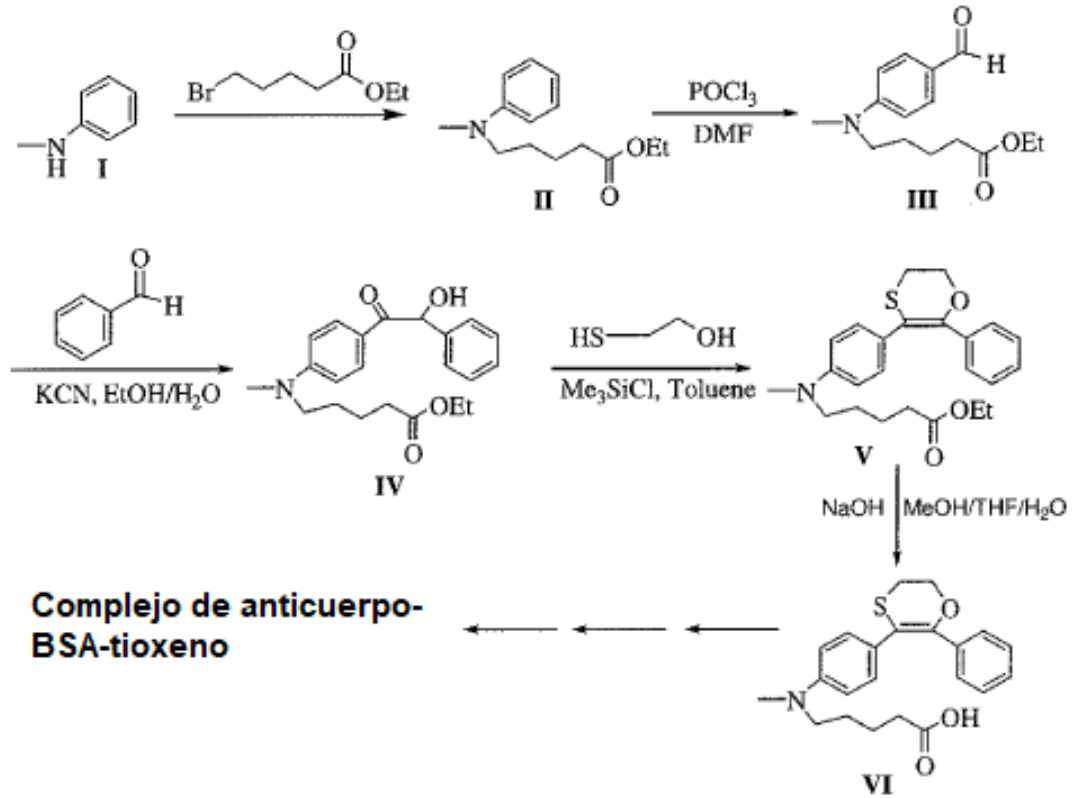
Figura 1

Figura 2

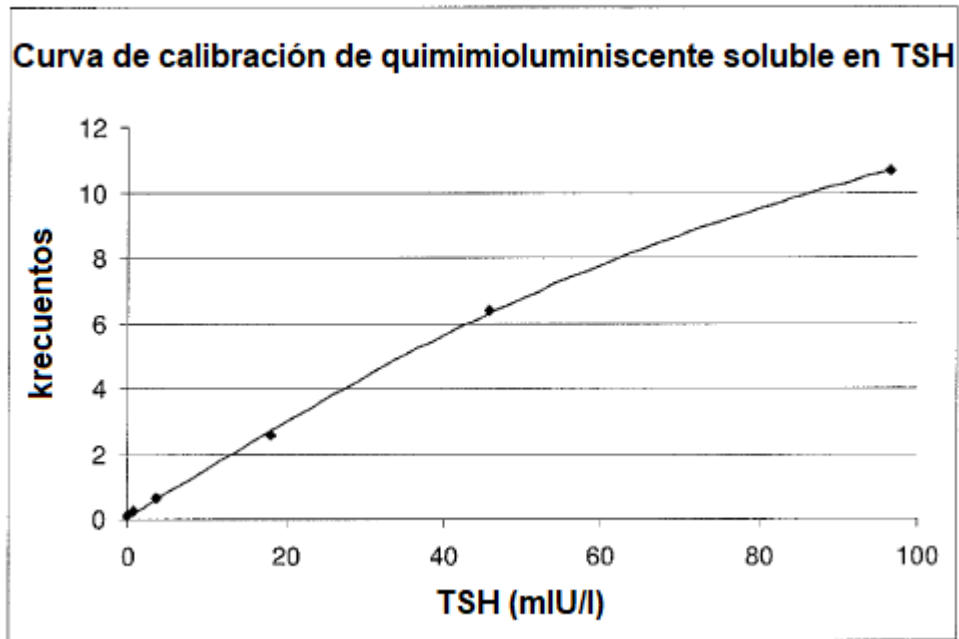


Figura 3

ID de muestra	recuentos	mIU/l	Media	DT	CV
Nivel A de 6BD036	0,10	-0,05	0,00	0,13	N/A
	0,13	0,14			
	0,09	-0,10			
Nivel B de 6BD036	0,24	1,02	0,98	0,05	4,89
	0,24	0,98			
	0,23	0,93			
Nivel C de 6BD036	0,67	4,06	3,89	0,24	6,26
	0,66	3,99			
	0,60	3,61			
Nivel D de 6BD036	2,55	17,00	17,07	0,18	1,07
	2,54	16,94			
	2,59	17,28			
Nivel E de 6BD036	6,26	45,50	46,32	1,45	3,12
	6,53	47,99			
	6,25	45,46			
Nivel F de 6BD036	10,77	98,06	96,43	3,61	3,74
	10,40	92,29			
	10,83	98,93			

Figura 4

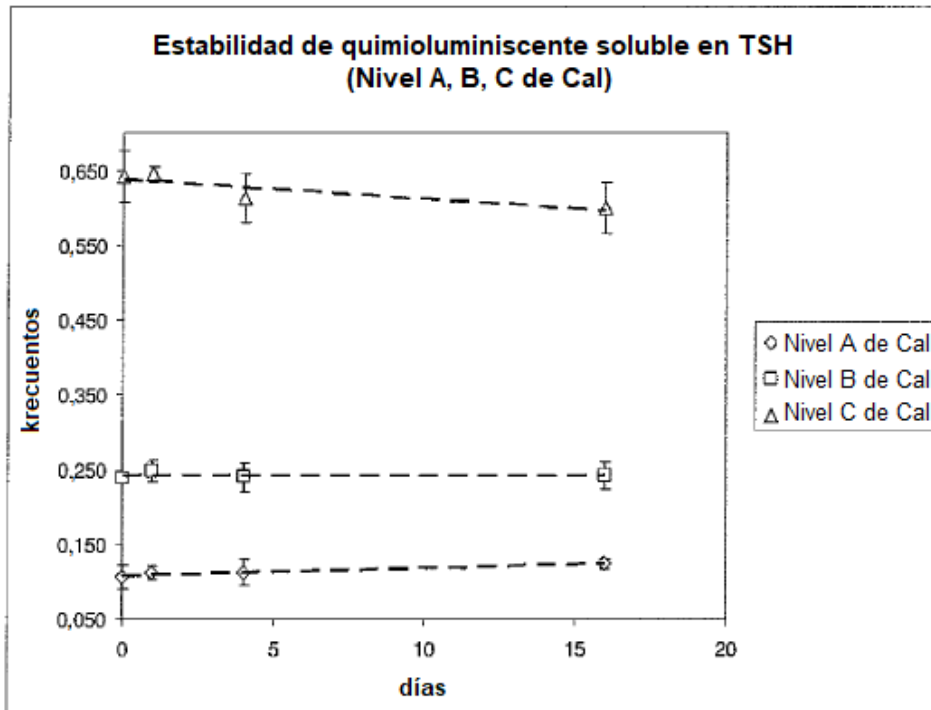


Figura 5

