

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 238**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2012 PCT/US2012/050399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2013 WO13025532**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2012 E 12824420 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2742352**

54 Título: **Detección de esteroides sexuales**

30 Prioridad:

12.08.2011 US 201161522758 P

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

05.06.2018

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.

(100.0%)

511 Benedict Avenue

Tarrytown, NY 10591-5098, US

72 Inventor/es:

LIN, SPENCER, H.;

FREEMAN, JAMES, V. y

YOKOYAMA, KEN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 671 238 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

Detección de esteroides sexuales

Antecedentes

- 5 La divulgación se relaciona con compuestos, métodos y kits para la detección de esteroides sexuales en muestras, tales como muestras de un sujeto, que se sabe o se sospecha que contienen un esteroide sexual.

10 Dos esteroides sexuales primarios son la testosterona y estradiol. La testosterona es el principal andrógeno en los hombres. Estimula la maduración adulta de los genitales externos y los órganos sexuales secundarios y el crecimiento de las barbas, el vello axilar y el vello púbico. Además, la testosterona tiene efectos anabólicos que conducen a un mayor crecimiento lineal, retención de nitrógeno y desarrollo molecular. Las principales causas de la disminución de los niveles de testosterona en los hombres incluyen hipogonadismo hipogonadotrópico, insuficiencia testicular, hiperprolactinemia, hipopituitarismo y algunos tipos de enfermedades hepáticas y renales. En las mujeres, el principal estrógeno es el estradiol. Los niveles de testosterona son mucho más bajos en las mujeres. Los niveles normales de andrógenos pueden proporcionar un sustrato para la producción de estrógenos. El aumento de los niveles séricos de testosterona en las mujeres puede ser indicativo de síndrome de ovario poliquístico e hiperplasia suprarrenal, entre otras afecciones.

15 El estradiol es la principal hormona reproductiva en mujeres no embarazadas. Es secretada por las células de la granulosa de los folículos ováricos en maduración en las mujeres y en pequeñas cantidades por las glándulas suprarrenales y los testículos en los hombres. El estradiol influye en la maduración y el mantenimiento del útero durante el ciclo menstrual normal. Durante la fase folicular temprana, los niveles de estradiol son bajos y relativamente constantes. Para el día siete, se establece el folículo dominante y el nivel de estradiol aumenta significativamente. El nivel elevado de estradiol suprime el nivel de la hormona folículo estimulante (FSH) por retroalimentación negativa en el hipotálamo y la glándula pituitaria y desencadena un aumento rápido de la hormona luteinizante (LH). El nivel de estradiol cae significativamente a medida que la LH alcanza su pico. Normalmente, la ovulación ocurre de 10 a 12 horas después del pico de LH y de 24 a 36 horas después del pico de estradiol. Durante la fase lútea aumenta el nivel de estradiol, alcanzando un nivel máximo unos 8 días después de la ovulación. El nivel elevado de estradiol está involucrado en la regresión del cuerpo lúteo. A menos que se produzca la fertilización del óvulo, el nivel de estradiol disminuye, lo que indica el inicio de un nuevo ciclo.

20 El documento US 6 201 141 B1 divulga un método para medir un esteroide por medio de un inmunoensayo competitivo, preferiblemente un inmunoensayo enzimático competitivo. El estradiol y la progesterona se pueden medir mediante el inmunoensayo. Se incuba una mezcla de una muestra de prueba que se sospecha que contiene un esteroide específico, una fase sólida acoplada a un anticuerpo específico para ese esteroide y un conjugado de un análogo de ese esteroide para formar complejos de esteroides/anticuerpos en la fase sólida. La fase sólida se separa de la mezcla, se mide la cantidad de marcador presente en la mezcla o en la fase sólida y la cantidad de esteroide en la muestra se determina a partir de la cantidad de marcador. El análogo del esteroide está de manera estructural estrechamente relacionado con el esteroide específico. La diferencia puede estar en la estereoquímica, por ejemplo, un grupo α -hidroxi en el esteroide se reemplaza por un grupo β -hidroxi, se reemplaza un sustituyente en el sistema de anillo esteroideo, por ejemplo, $-C\equiv CH$ por $-H$, o el grado de saturación se modifica, por ejemplo, en el anillo A del sistema de anillo esteroideo hay un doble enlace adicional. El conjugado de un análogo es un componente marcado que puede competir con el analito por los sitios de anticuerpos disponibles.

25 El artículo de Philip et al., Relative Binding of certain Steroids of low Polarity to human Sex Hormone-binding Globulin: Strong binding of 2-Methoxyestrone, a Steroid lacking the 17 β -OH Group in Steroids 47/6 [1986] 373-379 es un estudio de reactividades entrecruzadas para sitios de enlace en globulina de enlace a hormonas sexuales humanas (SHBG) de varios esteroides de baja polaridad. 2-Metoxi-estrone fue el único esteroide que carece de un grupo 17 β -hidroxilo que se enlaza a SHBG con fuerte afinidad.

30 El documento WO 2006/124456 A2 divulga un método para medir analitos en una muestra mediante inmunoensayo de partículas competitivas. El método comprende mezclar juntas una muestra, una pluralidad de micropartículas que tienen moléculas competidoras enlazadas a las mismas, y una proteína de enlace marcada fluorescentemente que se enlaza específicamente a un analito (véase la reivindicación 1). Los analitos preferidos son compuestos esteroides estrogénicos, en particular estradiol, estrona y derivados conjugados de los mismos. En ausencia de analito, la proteína de enlace marcada se enlazaría a las moléculas competidoras enlazadas a las micropartículas y se detectaría como fluorescencia asociada con las micropartículas.

35 El artículo de S. Gershagen, Subunits of Human Sex Hormone Binding Globulin, in J. Biol. Chem. 262 [1987] 8430-8437 divulga que el etilenglicol "podría tener" un efecto estabilizador sobre la globulina de enlace a hormonas sexuales (SHBG) similar a la del glicerol.

40 A la luz de lo anterior, los ensayos para detectar los niveles de un esteroide sexual en un sujeto pueden ser importantes para mantener el bienestar del sujeto o determinar si el sujeto tiene un cierto estado de enfermedad. En tales ensayos, el esteroide sexual debe liberarse de cualquier sustancia enlazadora endógena presente en una muestra para analizar.

Mientras más cantidad de esteroide sexual esté disponible para enlazarse a los reactivos de un sistema de detección empleado en un ensayo, más exacto es el ensayo.

- 5 Continúa la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico rápidos y precisos para medir los niveles de esteroides sexuales en los sujetos. Los métodos deben ser totalmente automatizables y precisos incluso cuando se realicen en muestras en las que el esteroide sexual está enlazado a sustancias de enlace endógenas, como, por ejemplo, muestras de sangre entera.

Sumario

- 10 Un ejemplo de un método de acuerdo con los principios descritos aquí se dirige a determinar un esteroide sexual en una muestra que se sospecha que contiene un esteroide sexual. En el método, se proporciona una combinación que comprende la muestra y la 2-alcoxiestróna, en la que el alcoxi tiene de 1 a 5 átomos de carbono, en una cantidad suficiente para liberar al menos una porción del esteroide sexual de las sustancias de enlace. En algunos ejemplos, la 2-alcoxiestróna es 2-metoxiestróna. El medio se incuba bajo condiciones para liberar el esteroide sexual de las sustancias de enlace. Un sistema de detección se agrega al medio. El sistema de detección comprende uno o más miembros para detectar el esteroide sexual en el que al menos un miembro es una pareja de enlace específico para el esteroide sexual. El medio se examina a continuación para la presencia de un complejo que comprende el esteroide sexual y una pareja de enlace específica para el esteroide sexual. La presencia y/o cantidad del complejo indican la presencia y/o cantidad del esteroide sexual en la muestra. En algunos ejemplos, uno o más miembros del sistema de detección están presentes en la combinación antes de incubar el medio.

- 20 Otro ejemplo de acuerdo con los principios descritos aquí es un kit para determinar una o ambas de la presencia y cantidad de un esteroide sexual en una muestra que se sospecha que contiene el esteroide sexual. El kit comprende un sistema de detección que comprende uno o más miembros para detectar el esteroide sexual en el que al menos un miembro es una pareja de enlace específico para el esteroide sexual, 2-alcoxiestróna en una cantidad suficiente para liberar al menos una porción del esteroide sexual de sustancias de enlace en las que alcoxi tiene de 1 a 5 átomos de carbono. En algunos ejemplos, la 2-alcoxiestróna es 2-metoxiestróna.

Breve descripción de los dibujos

- 30 Los dibujos proporcionados aquí no están a escala y se proporcionan con el fin de facilitar la comprensión de ciertos ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí y se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La Figura 1 es un gráfico que representa una curva de calibración de un ensayo ADVIA CENTAUR® Testosterona II (TSTOII) (el "ensayo TSTOII") en un ejemplo de acuerdo con los principios descritos aquí.

La Figura 2 es un gráfico que resume los resultados de un ensayo de testosterona que usa reactivos de ensayo LOCI® y un aparato DIMENSION VISTA® en un ejemplo de acuerdo con los principios descritos aquí.

- 35 La Figura 3 es un gráfico que resume los resultados de un ensayo de estradiol usando reactivos de ensayo LOCI® y un aparato DIMENSION VISTA® en un ejemplo de acuerdo con los principios descritos aquí.

La Figura 4 es un gráfico que resume los resultados de un ensayo de testosterona en un aparato de ensayo ADVIA CENTAUR® XP o ADVIA CENTAUR® CP en el que un agente de liberación comprende 2-metoxiestróna y cantidades variables de etilenglicol en un ejemplo de acuerdo con los principios descritos aquí.

- 40 Descripción detallada de realizaciones específicas

Discusión general

- 45 De acuerdo con los principios descritos aquí, se divulgan métodos para detectar un esteroide sexual que incluye la liberación de un esteroide sexual a partir de sustancias enlazadoras endógenas que pueden estar presentes en una muestra a analizar. Los métodos mejoran la disponibilidad del esteroide sexual para su posterior enlace a un reactivo de un sistema de detección que incluye una pareja de enlace específica para el esteroide sexual. En algunos ejemplos, se proporciona una combinación en un medio. La combinación comprende la muestra y una 2-alcoxiestróna, en la que alcoxi tiene de 1 a 5 átomos de carbono, en una cantidad suficiente para liberar al menos una porción del esteroide sexual de sustancias de enlace en la muestra. El medio se incuba bajo condiciones para liberar el esteroide sexual de las sustancias de enlace y el posterior enlace del mismo a la pareja de enlace específica para el esteroide sexual.

- 55 Los ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí se centran en la mitigación de resultados de ensayo inexactos causados por la reactividad cruzada de esteroides sexuales con sustancias de enlace endógenas que se enlazan a los esteroides sexuales. Los presentes ejemplos tienen aplicación a muchas técnicas de ensayo diferentes que incluyen, por ejemplo, ensayos homogéneos completamente automáticos en los que, antes del ensayo, no hay extracción o separación del esteroide sexual de otros constituyentes de una muestra o separación de sustancias de enlace endógenas de esteroides sexuales sustancias de la muestra antes de la determinación del ensayo. Como

resultado de los presentes ejemplos, se dispone de más esteroides sexuales para enlazarse a una pareja de enlace específica para el esteroide sexual tal como, por ejemplo, un anticuerpo para el esteroide sexual, que se emplea en un ensayo para la determinación del esteroide sexual.

5 La expresión "esteroide sexual" o "esteroides sexuales" tal como se usa aquí se refiere a hormonas esteroides que interactúan con los receptores de andrógenos o estrógenos. Los esteroides sexuales de interés incluyen, pero no se limitan a, testosterona y estradiol, por ejemplo. Los sujetos de interés incluyen, por ejemplo, mamíferos, incluidos humanos, aves, reptiles y otros vertebrados. Las sustancias de enlace endógenas incluyen, por ejemplo, globulinas tales como, por ejemplo, globulinas de enlace a hormonas sexuales y proteínas de plasma tales como, por ejemplo, albúmina.

10 El reactivo que se emplea para liberar un esteroide sexual de sustancias de enlace endógenas de una muestra tiene las características de un fuerte enlace a las sustancias de enlace endógenas, por ejemplo, globulina de enlace a hormonas sexuales (SHBG) y sustancialmente no se enlaza a la pareja de enlace específica para el esteroide sexual empleado en un sistema de detección. La frase "sustancialmente no hay enlace a la pareja de enlace específica para el esteroide sexual" se refiere a la reactividad cruzada del agente liberador con un miembro de un par de enlace de
15 una hormona sexual, por ejemplo, un anticuerpo anti testosterona o un anticuerpo anti estradiol donde la cantidad de enlace del agente de liberación a la pareja de enlace específica es menor que aproximadamente 0,010%, o menor que aproximadamente 0,005%, o menor que aproximadamente 0,001%. Aunque se conocen varias sustancias que muestran un fuerte enlace a sustancias de enlace endógenas para esteroides sexuales, los solicitantes han descubierto que una 2-alcoxiestróna exhibe tanto un fuerte enlace a las sustancias de enlace endógenas como
20 sustancialmente no se enlaza a una pareja de enlace específica para el esteroide sexual.

En algunos ejemplos, el número de átomos de carbono del alcoxi puede ser 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 5. El grupo alcoxi puede ser metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, t-butoxi, n-pentoxi, isopentoxi, t-butilmetoxi, por ejemplo. En algunos ejemplos, el reactivo es 2-metoxiestróna.

25 La 2-alcoxiestróna se puede añadir a un medio de ensayo directamente o se puede combinar con otros materiales en un medio separado para formar un medio de agente de liberación o un medio de pretratamiento que se puede combinar con el medio de ensayo anterior. En cualquier caso, la cantidad de 2-alcoxiestróna empleada depende de una o más de la naturaleza del esteroide sexual, la naturaleza de la muestra a examinar, la naturaleza del grupo alcoxi y el tipo de instrumentación empleada en un ensayo, por ejemplo. En algunos ejemplos, la cantidad en peso de 2-alcoxiestróna en el medio que comprende la muestra a analizar es de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 3%, o
30 aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2%, o aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0,2% a aproximadamente 3%, o aproximadamente 0,2% a aproximadamente 2%, o aproximadamente 0,2% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0,2% a aproximadamente 0,8%, o aproximadamente 0,2% a aproximadamente 0,6%, o aproximadamente 0,5% a aproximadamente 3%, o aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2%, o aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1%, por ejemplo.

35 Donde se añade 2-alcoxiestróna como parte de un medio de agente de liberación, el medio es normalmente un líquido, que puede reconstituirse con agua de un polvo liofilizado. El medio también puede comprender una o más de una sal reguladora seleccionada para mantener un pH apropiado (en muchos ejemplos, el pH para el medio está 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, por ejemplo); una sal inorgánica tal como, por ejemplo, cloruro de sodio; un bloqueador de proteína tal como, por ejemplo, albúmina de suero bovino; una gamma globulina de ratón, cabra u oveja; un anticoagulante tal como, por ejemplo, etilendiaminetetraacetato (EDTA) y heparina; un detergente, que puede ser neutro, iónico o zwitteriónico e incluye, por ejemplo, TWEEN® 20, TRITON® X-100, PLURONIC® L-64, dodecil sulfato de sodio (SDS), 3-[(3-colamidopropil)dimetil-amonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) o 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPSO); y un conservante tal como, por
40 ejemplo, azida sódica, Micro-O-Protect (Roche Biosciences Inc., Indianapolis IN) o sulfato de neomicina, por ejemplo. Las sustancias anteriores están presentes en el medio de agente de liberación en una cantidad suficiente para lograr un efecto deseado o para lograr el propósito deseado del agente particular. Por ejemplo, una sustancia que actúa como conservante está presente en el medio de liberación en una cantidad suficiente para lograr un efecto conservante.

50 El término "disponible" o "disponibilidad" como se usa aquí se refiere a la cantidad de esteroide sexual en una muestra que está disponible para la medición tal como, por ejemplo, disponible para enlazarse a un reactivo de un sistema de detección tal como, por ejemplo, una pareja de enlace específica para el esteroide sexual.

La expresión "disponibilidad mejorada" o "mejora de la disponibilidad" o "mejorar la disponibilidad" tal como se usa aquí se refiere a una mejora o aumento en la cantidad de esteroide sexual disponible para enlace a un reactivo de un
55 sistema de detección tal como, por ejemplo, una pareja de enlace específica para el esteroide sexual.

El término "alcoxi" incluye grupos alquilo de un número designado de átomos de carbono de configuración recta, ramificada o cíclica en la que el grupo alquilo incluye un oxígeno de éter para unirse a un compuesto original.

La expresión "al menos" tal como se usa aquí significa que la cantidad de elementos especificados puede ser igual o mayor que el número indicado. La expresión "aproximadamente", como se usa aquí, significa que el número indicado puede diferir en más o menos 10%; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un intervalo de 4,5 a 5,5.

5 Una muestra que se analizará es una que se sospecha que contiene un esteroide sexual. La muestra típicamente comprende una o más sustancias de enlace endógenas que se enlazan al esteroide sexual. Las muestras son preferiblemente de humanos u otros animales e incluyen fluidos biológicos tales como sangre total, suero, plasma, esputo, fluido linfático, semen, moco vaginal, heces, orina, fluido espinal, saliva, excrementos, fluido espinal cerebral, lágrimas y moco, por ejemplo; y tejido biológico tal como cabello, piel, secciones o tejidos extirpados de órganos u otras partes del cuerpo, por ejemplo. En muchos casos, la muestra es sangre completa, plasma o suero y, en ejemplos particulares, la muestra es plasma o suero. En ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí, la muestra no está pretratada para eliminar tales sustancias de enlace endógenas.

10 La muestra se puede preparar en cualquier medio conveniente que no interfiera con un ensayo; generalmente se emplea un medio acuoso. La naturaleza del medio depende de una o más de la naturaleza del esteroide sexual, la naturaleza de la 2-alcoxiestróna y la naturaleza de un ensayo. La naturaleza del medio se analiza con más detalle a continuación.

15 En ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí, una muestra sospechosa de contener un esteroide sexual se combina en un medio adecuado con una 2-alcoxiestróna en una cantidad suficiente para desplazar al menos una parte del esteroide sexual de las sustancias de enlace endógenas. La 2-alcoxiestróna no se enlaza en ningún grado significativo a una pareja de enlace específica para el esteroide sexual, tal como un anticuerpo para el esteroide sexual, que se usa en un ensayo. Con la frase "no se enlaza a ningún grado significativo" se quiere decir que el grado de enlace es suficientemente bajo para que pueda llevarse a cabo un ensayo preciso para el fármaco. En muchos ejemplos, la 2-alcoxiestróna desplaza el esteroide sexual de las sustancias de enlace endógenas para hacer que el esteroide sexual sea accesible para una pareja de enlace para el esteroide sexual.

20 La concentración o cantidad de 2-alcoxiestróna en el medio es suficiente para lograr el resultado deseado de liberar al menos una porción del esteroide sexual de sustancias de enlace endógenas para hacer accesible el esteroide sexual para enlazarse a un anticuerpo para el esteroide sexual como discutido anteriormente. La cantidad de 2-alcoxiestróna en el medio es suficiente para liberar al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99% del esteroide sexual de sustancias de enlace endógenas.

25 En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí, el medio puede comprender un poliol C₂ a C₆ que comprende 2 o 3 grupos hidroxilo en una cantidad suficiente para potenciar, en presencia de una 2-alcoxiestróna, la liberación de un esteroide sexual de sustancias de enlace endógenas. Tales polioles incluyen, pero no se limitan a, etilenglicol, propilenglicol y glicerol, por ejemplo. El poliol puede estar presente en el medio en una cantidad en peso de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 40%, de 0,1% a aproximadamente 30%, o aproximadamente 0,1% a aproximadamente 20%, o aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5%, o aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2%, o aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 30%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 2%, por ejemplo.

Descripción general de ensayos para un esteroide sexual

30 Una muestra sospechosa de contener un esteroide sexual se combina en un medio apropiado con una 2-alcoxiestróna en una cantidad efectiva para liberar el esteroide sexual de sustancias de enlace endógenas. Antes de la incubación, el medio también puede comprender uno o más reactivos de un sistema de detección tal como, por ejemplo, un reactivo de anticuerpo. El medio puede incubarse con muestras bajo condiciones para liberar el esteroide sexual de sustancias de enlace endógenas. Dependiendo de las condiciones del ensayo, el período de incubación puede ser de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 60 minutos, o aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 10 minutos, por ejemplo. La temperatura durante la incubación es de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 40 °C, o aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C, o aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C, o aproximadamente 10 °C a aproximadamente 30 °C, o aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, o aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C o aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, por ejemplo. Después del período de incubación anterior, se emplea un sistema de detección, que comprende reactivos para determinar una o ambas de la presencia y la cantidad del esteroide sexual en la muestra. Los componentes del sistema de detección se agregan al medio para realizar un ensayo para el esteroide sexual. La naturaleza de los reactivos del sistema de detección depende principalmente del tipo particular de ensayo que se realizará. En general, el ensayo es un método para la determinación o medición de una o ambas de la presencia y cantidad de un analito de esteroide sexual. Diversos métodos de ensayo se discuten a continuación a modo de ilustración y no de limitación.

55 En muchos ejemplos, los reactivos del sistema de detección comprenden al menos una pareja de enlace específica para el esteroide sexual, que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para el esteroide sexual. Con la frase

"anticuerpo específico para el esteroide sexual" se entiende un anticuerpo que se enlaza específicamente al esteroide sexual y no se enlaza de manera significativa a otras sustancias que distorsionarían el análisis para el esteroide sexual.

5 Los anticuerpos específicos para un esteroide sexual para uso en inmunoensayos pueden ser monoclonales o policlonales. Dichos anticuerpos se pueden preparar mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica, tales como inmunización de un huésped y colección de sueros (policlonales) o preparando líneas celulares continuas híbridas y recolectando la proteína secretada (monoclonal) o clonando y expresando 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.

10 Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmento de la misma, tales inmunoglobulinas incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos donde sea apropiado siempre que se mantenga la afinidad de enlace por una molécula particular.

15 Los anticuerpos que contienen antisuero (policlonal) se obtienen mediante técnicas bien establecidas que implican la inmunización de un animal, tal como un conejo, cobaya o cabra, con un inmunógeno apropiado y la obtención de antisueros de la sangre del animal inmunizado después de un periodo de espera apropiado. Los anticuerpos también se pueden obtener mediante técnicas de hibridación de células somáticas, denominándose comúnmente estos anticuerpos como anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse de acuerdo con las técnicas estándar de Köhler y Milstein, Nature 265:495-497, 1975. En otra metodología para la preparación de anticuerpos, la secuencia que codifica para los sitios de enlace del anticuerpo se puede escindir del ADN del cromosoma y se puede insertar en un vector de clonación, que puede expresarse en bacterias para producir proteínas recombinantes que tienen los sitios de enlace de anticuerpo correspondientes.

25 Como se discutió anteriormente, un anticuerpo seleccionado para uso en un inmunoensayo para un esteroide sexual debería enlazar específicamente y preferencialmente el esteroide sexual sobre otros ligandos tales como otras hormonas sexuales. Por ejemplo, un anticuerpo para testosterona debería enlazar específica y preferencialmente testosterona sobre, por ejemplo, estradiol. En general, un anticuerpo debe ser capaz de distinguir entre un esteroide sexual de interés en relación con otro esteroide sexual. Al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 20 veces, del esteroide sexual de interés se enlazará al anticuerpo si el anticuerpo se combina con una muestra que contiene el esteroide sexual de interés.

30 Se incluyen otros reactivos en el medio de ensayo dependiendo de la naturaleza del ensayo que se realizará. Como se menciona brevemente anteriormente, tales ensayos generalmente implican reacciones entre parejas de enlace específicas tales como un analito de esteroides sexuales y un anticuerpo correspondiente para el esteroide sexual o el enlace entre un anticuerpo y una pareja de enlace correspondiente tal como un segundo anticuerpo que se enlaza al primer anticuerpo. Por consiguiente, la pareja de enlace específica puede ser una proteína, que puede ser un anticuerpo o un antígeno. La pareja de enlace específica es un miembro de un par de enlace específico ("miembro sbp"), que es una de dos moléculas diferentes, que tiene un área en la superficie o en una cavidad, que se enlaza específicamente a y se define por lo tanto como complementaria con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de enlace específico generalmente serán miembros de un par inmunológico tal como antígeno:anticuerpo, aunque otros pares de enlace específicos tales como biotina:avidina, hormonas:receptores de hormonas, enzima:sustrato, dúplex de ácidos nucleicos, IgG:proteína A, y pares polinucleótidos tales como ADN:ADN, ADN:ARN, por ejemplo, no son pares inmunológicos, pero están incluidos dentro del alcance del término "miembro sbp".

45 El enlace específico implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes para el otro en comparación con un reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otro lado, el enlace no específico implica el enlace no covalente entre las moléculas que es relativamente independiente de las estructuras superficiales específicas. El enlace no específico puede ser el resultado de varios factores, incluidas las interacciones hidrófobas entre moléculas.

50 Se pueden emplear muchos tipos de inmunoensayos en los presentes métodos para determinar una o ambas, la presencia y cantidad de un analito de esteroides sexuales en una muestra que se sospecha que contiene dicho analito. Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos no marcados comprenden usualmente la formación de complejos relativamente grandes que implican uno o más anticuerpos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitación y aglutinación y técnicas de dispersión de luz correspondientes tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpos.

55 En muchos de los ensayos discutidos aquí, se emplea un marcador y en muchos ejemplos es parte de un conjugado de esteroides sexuales. Por otro lado, el marcador puede ser parte de un reactivo independiente de un conjugado de esteroides sexuales. El marcador suele ser parte de un sistema de producción de señal ("sps"). La naturaleza del marcador depende del formato de ensayo particular. Un sistema de producción de señal normalmente incluye uno o más componentes, al menos un componente es un marcador detectable, que genera una señal detectable que se

relaciona con la cantidad de marcador enlazado y/o no enlazado, es decir, la cantidad de marcador enlazado o no enlazado al esteroide sexual que está siendo detectado o a un agente que refleja la cantidad de esteroides sexuales que se detectarán.

5 El marcador es cualquier molécula que produce o puede ser inducida para producir una señal, y puede ser, por ejemplo, un radiomarcador, un fluorescente, una enzima, un quimiluminiscente o un fotosensibilizador. La señal se detecta y/o mide al detectar radiactividad, actividad enzimática, luminiscencia o absorbancia de la luz, según sea el caso. En algunos ejemplos, los marcadores son radioisotópicos, luminiscentes, particulados o enzimáticos. El marcador puede ser un poli (aminoácido), o proteína, o no poli (aminoácido), isotópico o no isotópico, usualmente no isotópico, y puede ser un catalizador, como una enzima, un polinucleótido que codifica un catalizador, promotor, 10 pigmento, molécula fluorescente, molécula quimiluminiscente, coenzima, sustrato enzimático, grupo radioactivo, una pequeña molécula orgánica, secuencia polinucleotídica amplificable, una partícula tal como látex o partícula de carbono, sol de metal, cristalita, liposoma, célula, etc. que puede o no estar marcado adicionalmente con un pigmento, catalizador u otro grupo detectable, y similares.

15 El término "marcadores que no son poli (aminoácidos)" se refiere a aquellos marcadores que no son proteínas. Un marcador que no sea poli (aminoácido) puede ser un miembro de un sistema de producción de señal. El marcador no poli (aminoácido) es capaz de detectarse directamente o es detectable a través de una reacción de enlace específica que produce una señal detectable. Los marcadores que no son poli (aminoácidos) generalmente son radioisotópicos, luminiscentes (como, por ejemplo, ésteres de acridinio), particulados (como, por ejemplo, partículas magnéticas que pueden separarse enlazadas de partículas de látex no enlazadas que se pueden medir mediante turbidez y nefelometría, y perlas de quimiluminiscencia (por ejemplo, quimiperlas LOCI®), por ejemplo. Los marcadores poli 20 (aminoácidos) incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, péptidos y proteínas tales como, por ejemplo, enzimas, por ejemplo.

Marcadores adecuados incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, enzimas tales como fosfatasa alcalina, 25 glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH") y peroxidasa de rábano picante; ribozima; un sustrato para una replicasa tal como QB replicasa; promotores; pigmentos; fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina; complejos tales como los preparados a partir de CdSe y ZnS presentes en nanocristales semiconductores conocidos como puntos cuánticos; quimiluminiscentes tales como isoluminol; sensibilizadores; coenzimas; sustratos de enzima; radiomarcadores tales como ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴C, ³H, ⁵⁷Co y ⁷⁵Se; partículas tales como partículas de látex, partículas de carbono, partículas metálicas 30 que incluyen partículas magnéticas, por ejemplo, partículas de dióxido de cromo (CrO₂) y similares; sol de metal; cristalita; liposomas; células, etc., que pueden marcarse adicionalmente con un pigmento, catalizador u otro grupo detectable. Enzimas y coenzimas adecuadas se divulgan en Litman, et al., Patente de Estados Unidos No. 4,275,149, columnas 19-28, y Boguslaski, et al., Patente de Estados Unidos No. 4,318,980, columnas 10-14; fluorescentes y quimiluminiscentes adecuados se divulgan en Litman, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,275,149, en las 35 columnas 30 y 31.

El marcador puede producir directamente una señal y, por lo tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo, fluorescentes, son capaces de absorber luz ultravioleta y visible, donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía 40 excitada. Esta energía absorbida se disipa luego mediante la emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otras etiquetas que producen directamente una señal incluyen isótopos radiactivos y pigmentos.

Alternativamente, el marcador puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema de producción de señal incluiría entonces todos los componentes requeridos para producir una señal medible. Dichos otros componentes pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, depuradores, iones metálicos y una 45 sustancia de enlace específica requerida para el enlace de sustancias generadoras de señal.

Las enzimas de interés particular como proteínas marcadoras son enzimas redox, particularmente deshidrogenasas tales como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, etc., y enzimas que implican la producción de peróxido de hidrógeno y el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de pigmento a un pigmento. Las combinaciones particulares incluyen sacarido oxidasas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasas, u oxidasas 50 heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasas, acoplada con una enzima que emplea el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de pigmento, es decir, una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa, o microperoxidasa. Cuando se utiliza una única enzima como un marcador, otras enzimas pueden encontrar uso tales como hidrolasas, transferasas y oxidorreductasas, preferiblemente hidrolasas tales como fosfatasa alcalina y betagalactosidasa. Alternativamente, se pueden usar luciferasas tales como luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana. Las coenzimas ilustrativas que encuentran uso incluyen NAD[H], NADP[H], fosfato de piridoxal, 55 FAD[H], FMN[H], etc., usualmente coenzimas que implican reacciones cíclicas. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 4,318,980.

Con proteínas marcadoras, tales como, por ejemplo, enzimas, el intervalo de peso molecular será de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 600.000, o desde aproximadamente 10.000 a aproximadamente 60 300.000 de peso molecular. Generalmente hay al menos aproximadamente 1 análogo de esteroide sexual por

aproximadamente 200.000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 150.000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 100.000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 50.000 de peso molecular, y así sucesivamente. En el caso de enzimas, el número de grupos de análogos de esteroides sexuales es usualmente desde 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 2 a aproximadamente 15, aproximadamente 3 a aproximadamente 12, o aproximadamente 6 a aproximadamente 10.

Un grupo general de inmunoensayos que pueden emplearse incluye inmunoensayos que usan una concentración limitada de anticuerpo. Otro grupo de inmunoensayos implica el uso de un exceso de uno o más de los reactivos principales tales como, por ejemplo, un exceso de un anticuerpo para el esteroide sexual. Otro grupo de inmunoensayos son los ensayos homogéneos libres de separación en los que los reactivos marcados modulan la señal de marcado tras las reacciones de enlace a anticuerpos de esteroides sexuales. Otro grupo de ensayos incluye ensayos competitivos limitados de reactivos de anticuerpo marcados para esteroides sexuales. En este tipo de ensayo, un conjugado de soporte de esteroides sexuales está presente en una cantidad constante y limitada. La partición de un marcador entre el analito de esteroides sexuales inmovilizados y el analito de esteroides sexuales libres depende de la concentración del analito de esteroides sexuales en la muestra.

Los ensayos pueden realizarse sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT® (Syva Company, San Jose, CA) divulgado en Rubenstein, et al., Patente de Estados Unidos No. 3,817,837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los divulgados en Ullman, et al., Patente de Estados Unidos No. 3,996,345, columna 17, línea 59, a columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") tales como los divulgados en Maggio, et al., Patente de Estados Unidos No. 4,233,402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; y el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") como se divulga, por ejemplo, en, entre otros, la Patente de Estados Unidos No. 5,354,693; por ejemplo.

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por enzimas moduladas ("EMMIA") discutido por Ngo y Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116: 285-288; el inmunoensayo de fluorescencia de sustrato marcado ("SLFIA") divulgado por Oellerich, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1984) 22:895-904; los inmunoensayos combinados de donantes de enzimas ("CEDIA") divulgados por Khanna, et al., Clin. Chem. Acta (1989) 185:231-240; y los inmunoensayos marcados con partículas homogéneas tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrica mejorados con partículas ("PETINIA"), inmunoensayo turbidimétrico mejorado con partículas ("PETIA"), etc.; por ejemplo.

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"); el inmunoensayo de pigmento disperso ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos enzimáticos de membrana ("EMIA"); y los luminoinmunoensayos ("LIA"); por ejemplo. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensor que implican el control de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de una superficie inmovilizada por anticuerpo tras el enlace de un analito de esteroides sexuales. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensor óptico, ensayos de inmunosensor acústico, ensayos de inmunosensor de semiconductor, ensayos de inmunosensor de transductor electroquímico, ensayos de inmunosensor potenciométricos y ensayos de electrodo amperométrico. En algunas realizaciones, pueden utilizarse inmunoensayos de múltiples analitos donde el analito de esteroides sexuales puede ser el sujeto de detección junto con uno o más analitos diferentes, tales como otras hormonas o fármacos, por ejemplo. Dichos sistemas de múltiples analitos se describen, por ejemplo, en Loor, et al., J. Anal. Toxicol. 12:299 (1988).

Los ensayos discutidos anteriormente se llevan a cabo generalmente en un medio acuoso regulado a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El pH para el medio de ensayo puede estar 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, por ejemplo. El pH generalmente será un compromiso entre el enlace óptimo de los miembros de enlace de cualquiera de los pares de enlace específicos y el pH óptimo para otros reactivos del ensayo tales como miembros de un sistema de producción de señal, por ejemplo.

Se pueden usar diversos reguladores en un medio de ensayo para alcanzar el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital y similares. El regulador particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro regulador. Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en los métodos anteriores. Por ejemplo, además de reguladores, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. Frecuentemente, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; y potenciadores de enlace, por ejemplo.

Se pueden aplicar uno o más periodos de incubación al medio a uno o más intervalos que incluyen cualquier intervalo entre las adiciones de diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio generalmente se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca el enlace de diversos componentes de los reactivos. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y, por lo general, temperatura constante, preferiblemente temperatura ambiente, durante el período de medición. Las temperaturas de incubación normalmente oscilan desde aproximadamente 5 °C a aproximadamente 99 °C, o desde aproximadamente 15 °C a aproximadamente 70 °C, o desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo. El período de

tiempo para la incubación es aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo. El período de tiempo depende de una o más de la temperatura del medio y la rata de enlace de los diversos reactivos, por ejemplo. Las temperaturas durante las mediciones generalmente oscilarán entre aproximadamente 10 °C a aproximadamente 50 °C, o desde aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C, por ejemplo.

La concentración de analito que se puede ensayar generalmente varía desde aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-17} M, o desde aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-14} M, por ejemplo. Consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (relativo a la cantidad de analito de esteroides sexuales 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 generalmente se determinarán por el intervalo de concentración de interés del analito tal como, por ejemplo, un analito de esteroide sexual y la naturaleza del ensayo, por ejemplo. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo en el intervalo de interés. Es decir, una variación en la concentración del analito de esteroides sexuales que es significativa debería proporcionar una diferencia de señal medible con exactitud. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema de producción de señal y la naturaleza de los analitos normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Si bien el orden de adición puede variar ampliamente, habrá ciertas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden más simple de adición es agregar todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Alternativamente, los reactivos se pueden combinar secuencialmente. En algunos ejemplos, puede estar involucrado una etapa de incubación posterior a cada paso de adición como se discutió anteriormente.

Etapa de examen

En una siguiente etapa de un método de acuerdo con los principios descritos aquí, el medio se examina para una o ambas, la presencia y cantidad de un complejo que comprende el esteroide sexual y la pareja de enlace específica para el esteroide sexual. Una o ambas, la presencia y la cantidad del complejo indican una o ambas, la presencia y la cantidad del esteroide sexual en la muestra.

La frase "medir la cantidad de un analito de esteroides sexuales" se refiere a la determinación cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa del analito de esteroides sexuales. Los métodos que son cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, así como todos los otros métodos para determinar un analito de esteroides sexuales, se consideran métodos para medir la cantidad de un analito de un esteroide sexual. Por ejemplo, se considera que un método que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito de esteroide sexual en una muestra que se sospecha que contiene un analito de un esteroide sexual, está incluido dentro del alcance de la presente invención. Los términos "detección" y "determinación", así como otros sinónimos comunes para medir, se contemplan dentro del alcance de los términos anteriores.

En muchos ejemplos, el examen del medio implica la detección de una señal del medio. Una o ambas, la presencia y la cantidad de la señal se relacionan con una o ambas, la presencia y la cantidad del esteroide sexual en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza del sistema de producción de señal. Como se discutió anteriormente, existen numerosos métodos mediante los cuales un marcador de un sistema de producción de señal puede producir una señal detectable por medios externos, deseablemente mediante examen visual, e incluye, por ejemplo, radiación electromagnética, electroquímica, calor, detección de radioactividad y reactivos químicos.

La activación de un sistema de producción de señal depende, por ejemplo, de la naturaleza de los miembros del sistema de producción de señal. Para aquellos miembros de un sistema de producción de señal que se activan con luz, el miembro se irradia con luz. Para los miembros de sistemas de producción de señal que se encuentran en la superficie de una partícula, la adición de una base puede dar como resultado la activación. Para algunos sistemas de producción de señal, no es necesario ningún agente para la activación, como los sistemas que implican un marcador que es un marcador radioactivo, una enzima, etc. Para los sistemas enzimáticos, puede ser necesaria la adición de uno o ambos de un sustrato y un cofactor.

El examen para una o ambas, la presencia y la cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es 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, un fluorómetro, un espectrómetro de absorción, un luminómetro, un quimiluminómetro, un actinómetro o un instrumento fotográfico, por ejemplo. La presencia y la cantidad de señal detectada se relacionan con la presencia y la cantidad del esteroide sexual presente en una muestra. Como se mencionó anteriormente, las temperaturas durante las mediciones oscilan generalmente desde aproximadamente 10 °C a aproximadamente 70 °C, o desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, o desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, por

ejemplo. En una metodología, las curvas estándar se forman usando concentraciones conocidas de los analitos a analizar. Como se discutió anteriormente, también se pueden usar calibradores y otros controles.

Realizaciones específicas de ensayos

5 Los siguientes ejemplos describen ejemplos específicos de acuerdo con los principios descritos aquí y se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación. Los ejemplos están destinados simplemente a describir, y no a limitar, el alcance de la presente divulgación y las reivindicaciones adjuntas.

10 En un ensayo homogéneo después de que se hayan combinado todos los reactivos, la señal se determina y se relaciona con la cantidad de analito de esteroide sexual en una muestra. Por ejemplo, en un ensayo EMIT® para un esteroide sexual, una muestra que se sospecha que contiene el esteroide sexual se combina en un medio acuoso con una 2-alcoxiesterona y simultáneamente o secuencialmente con un anticuerpo capaz de reconocer el esteroide sexual y un reactivo que comprende un conjugado del esteroide sexual y una enzima. Se agrega un sustrato para la enzima, que da como resultado la formación de un producto cromogénico o fluorogénico tras la reacción catalizada por enzima. Los ejemplos de enzimas son glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina, pero pueden emplearse otras enzimas. El analito de esteroides sexuales y la unidad estructural de esteroide sexual del conjugado enzimático compiten por los sitios de enlace en el anticuerpo. Luego se determina la actividad de la enzima en el medio, usualmente por medios espectrofotométricos, y se compara con la actividad de la enzima determinada cuando se prueban los calibradores o las muestras de referencia, en las que está presente una cantidad conocida del esteroide sexual. Típicamente, los calibradores se prueban de manera similar a la prueba de la muestra que se sospecha que contiene un analito de esteroide sexual. Los calibradores contienen concentraciones diferentes pero conocidas del analito de esteroide sexual a determinar. En la mayoría de los ejemplos, los intervalos de concentración presentes en los calibradores abarcan el intervalo de concentraciones sospechosas de analitos de esteroide sexual en muestras desconocidas.

15 Los ensayos heterogéneos usualmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Se divulgan una variedad de formatos de ensayo competitivos y no competitivos en Davalian, et al., Patente de Estados Unidos No. 5,089,390, columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9. En un tipo de ensayo competitivo, un soporte, como se discute aquí, que tiene anticuerpos para el esteroide sexual enlazado al mismo se pone en contacto con un medio que contiene la muestra que se sospecha que contiene un analito de esteroide sexual que se ha combinado con una 2-alcoxiesterona. Un reactivo que es un conjugado del esteroide sexual y una enzima se agrega al medio. Después de separar el soporte y el medio, la actividad de la enzima del soporte o el medio se determina mediante técnicas convencionales y se relaciona con una o ambas, la presencia y cantidad del esteroide sexual en la muestra. En ciertos ejemplos, se puede emplear una segunda enzima además de la enzima del conjugado enzimático. Las enzimas del par de enzimas están relacionadas de manera que un producto de la primera enzima sirve como sustrato para la segunda enzima.

20 Otro ejemplo de un formato de ensayo es un ensayo de captura. En este formato de ensayo, el anticuerpo para el esteroide sexual se enlaza covalentemente a una partícula magnética. La muestra se incuba con una 2-alcoxiesterona y con estas partículas para permitir que el esteroide sexual en la muestra se enlace a los anticuerpos para el esteroide sexual. Posteriormente, se incuba un reactivo que comprende un conjugado del esteroide sexual enlazado a una enzima con las partículas magnéticas. Después del lavado, se mide la cantidad de enzima que está enlazada a las partículas magnéticas y está inversamente relacionada con una o ambas, la presencia y cantidad del esteroide sexual en la muestra.

25 Las siguientes descripciones de ensayo específicas son a modo de ilustración de, y no como una limitación sobre, el alcance de los presentes ejemplos.

30 En un ejemplo de acuerdo con los principios descritos aquí, una muestra de prueba o un estándar de esteroide sexual se mezcla con una 2-alcoxiesterona y con un reactivo conjugado que es un conjugado del esteroide sexual y la biotina. Se permite que el esteroide sexual de la muestra de prueba y el esteroide sexual del reactivo conjugado compitan por el enlace al anticuerpo para el esteroide sexual, que es capaz de enlazarse al analito del esteroide sexual o a la unidad estructural del esteroide sexual del reactivo conjugado. Después de enjuagar con un regulador de lavado apropiado, se puede añadir al medio una molécula de detección que consiste en estreptavidina o avidina conjugada a una enzima, molécula fluorescente o quimiluminiscente o unidad estructural radioactiva, que luego se examina para una o ambas, la presencia y cantidad de señal. Uno o ambos, la presencia y la cantidad de señal están relacionados con uno o ambos, la presencia y cantidad de esteroide sexual.

35 En un ejemplo de acuerdo con los principios descritos aquí, el ensayo empleado es un ensayo de luminiscencia inducida (ensayo LOCI®), que se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,340,716 (Ullman, et al.).

40 En una metodología, los reactivos incluyen dos reactivos de perlas de látex y un anticuerpo monoclonal anti esteroide sexual biotinilado de ratón. El primer reactivo en perlas es un conjugado en el que una perla de látex que contiene un pigmento quimiluminiscente está recubierta con moléculas del esteroide sexual. El segundo reactivo en perlas está recubierto con estreptavidina y contiene un pigmento fotosensibilizador. En una primera etapa, la muestra sospechosa de contener esteroide sexual se incuba con una 2-alcoxiesterona y con anticuerpo biotinilado para el esteroide sexual,

lo que permite que el esteroide sexual de la muestra sature una fracción del anticuerpo biotinilado donde la fracción está directamente relacionada con la concentración del esteroide sexual en el medio. En una segunda etapa, se agrega el primer reactivo en perlas y conduce a la formación de inmunocomplejos de anticuerpos biotinilados de perlas con la fracción no saturada del anticuerpo biotinilado. Luego se agrega el segundo reactivo en perlas y se enlaza a la biotina para formar inmunocomplejos de pares de perlas. Cuando se ilumina con luz, por ejemplo, a 680 nm, el segundo reactivo en perlas convierte el oxígeno disuelto en la solución de reacción en la forma más energética de oxígeno singlete. En los pares de perlas, el oxígeno singlete se difunde en el primer reactivo en perlas, desencadenando así una reacción quimiluminiscente. La señal quimiluminiscente resultante se mide, por ejemplo, a 612 nm y es una función inversa de la concentración de esteroide sexual en la muestra. La cantidad de esta señal está relacionada con una o ambas, la presencia y la cantidad de esteroide sexual en la muestra.

En un ejemplo de acuerdo con los principios descritos aquí, el formato del ensayo es ACMIA (Ensayo inmunológico mediado por dióxido de cromo con afinidad). Para el formato de ensayo ACMIA, se emplea un reactivo que es un conjugado de analito de esteroide sexual y partículas de cromo, cuyo reactivo puede designarse como un primer componente. Un segundo componente es un anticuerpo para el esteroide sexual. Este anticuerpo, entrecruzado a una enzima informadora (por ejemplo, betagalactosidasa), se agrega a un recipiente de reacción en una cantidad en exceso, es decir, una cantidad mayor que la requerida para enlazar todo el analito de esteroide sexual que podría estar presente en una muestra. El conjugado anticuerpo enzima se mezcla con una muestra sospechosa de contener el esteroide sexual, que se ha tratado con una 2-alcoxiestrona, para permitir que el analito de esteroide sexual se enlace al anticuerpo. A continuación, se agrega el reactivo de partículas de cromo para enlazar cualquier exceso de conjugado anticuerpo enzima. Luego, se aplica un imán, que extrae todas las partículas de cromo y el exceso de enzima anticuerpo de la suspensión, y el sobrenadante se transfiere a un recipiente de reacción final. El sustrato de la enzima informadora se agrega al recipiente de reacción final, y la actividad de la enzima se mide espectrofotométricamente como un cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo. La cantidad de esta señal está relacionada con uno o ambos, la presencia y cantidad de esteroide sexual en la muestra.

Otro ejemplo particular de un ensayo que puede emplearse para la determinación de un analito de esteroide sexual se discute en la patente de los Estados Unidos No. 5,616,719 (Davalian, et al.), que describe inmunoensayos de canalización de oxígeno fluorescente.

Kits

Los reactivos para llevar a cabo un ensayo particular pueden estar presentes en un kit útil para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito de esteroide sexual. En un ejemplo de acuerdo con los principios descritos aquí, un kit comprende en combinación empaquetada un anticuerpo para un analito de esteroide sexual, 2-alcoxiestrona en una cantidad suficiente para liberar al menos una porción del esteroide sexual de sustancias de enlace, y otros reactivos para realizar un ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular. Un reactivo incluye una pareja de enlace específica para el esteroide sexual, que puede conjugarse con un miembro de un sistema de producción de señal (sps) tal como, por ejemplo, un marcador. Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o diversos reactivos pueden combinarse en uno o más recipientes dependiendo 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 tal como miembros de sbp adicionales, miembros de sps, y reactivos auxiliares tales como un sustrato enzimático auxiliar, y así sucesivamente. 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 deben producirse durante el procedimiento de ensayo y además optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Bajo circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse como un polvo seco, generalmente liofilizado, incluidos excipientes, que al disolverse proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo de acuerdo con los principios descritos aquí. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método de acuerdo con la presente invención como se describió anteriormente.

Ejemplos

La siguiente discusión está dirigida a ejemplos específicos de acuerdo con los principios descritos aquí a modo de ilustración y no de limitación; los ejemplos específicos no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación y las reivindicaciones adjuntas. A menos que se indique lo contrario, los materiales en los experimentos a continuación se pueden comprar en Aldrich Chemical Company, St. Louis MO. Las partes y porcentajes divulgados aquí son en peso a menos que se indique lo contrario.

Los experimentos se llevan a cabo de una manera en base al ensayo ADVIA CENTAUR® Testosterona II (TSTOII) (el "ensayo TSTOII") (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield IL). El ensayo es un inmunoensayo competitivo cuantitativo que emplea partículas paramagnéticas y tecnología quimiluminiscente y está destinado a su uso en la determinación cuantitativa de testosterona total (enlazada y no enlazada) en suero y plasma humanos. El sistema de detección empleado para el ensayo TSTOII incluye un anticuerpo de oveja monoclonal marcado con biotina anti testosterona (anticuerpo de captura) como el conjugado de biotina o conjugado de captura, partículas de látex

paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (LODESTARS™) como una fase sólida (SP) y una testosterona marcada con éster de acridinio (hapteno de detección) como el conjugado de reactivo Lite. La testosterona en una muestra de paciente o calibrador compete con el hapteno marcado con éster de acridinio para enlazarse con el anticuerpo anti testosterona. El ensayo TSTOII también incluye calibradores y diluyente para diluir en un intervalo de muestras positivas. En algunas pruebas, la cubeta que contenía el anticuerpo monoclonal de oveja anti testosterona marcado con biotina también contenía 2-metoxiestrona como agente de liberación de acuerdo con los principios descritos aquí, cuya composición se expone a continuación. La cubeta que carecía del anticuerpo monoclonal de oveja anti testosterona marcado con biotina se empleó con fines de comparación. También se empleó para fines de comparación una cubeta que contenía el reactivo de anticuerpo monoclonal de oveja anti testosterona marcado con biotina pero no 2-metoxiestrona. La composición de cada uno de los reactivos se expone a continuación con más detalle.

El sistema que lleva a cabo el ensayo TSTOII automáticamente realiza los siguientes pasos: dispensa 20 µL de muestra en una cubeta. Dispensa 90 µL de reactivo que contiene 2-metoxiestrona y anticuerpo monoclonal de oveja anti testosterona marcado con biotina e incuba durante 10,25 minutos a 37 °C. Dispensa 150 µL de partículas de látex paramagnético recubiertas con estreptavidina y luego 50 µL de conjugado de hapteno marcado con éster de acridinio e incuba durante 3,75 minutos a 37 °C. Separa, aspira y lava las cubetas con Lavado 1 (solución salina regulada con fosfato (PBS), solución de pH 7,4/TWEEN®). Dispensa 300 µL cada uno de Reactivo 1 (ácido nítrico y peróxido de hidrógeno) y Reactivo 2 (hidróxido de sodio) para iniciar la reacción de quimiluminiscencia. Reporta los resultados de acuerdo con la opción seleccionada, como se describe en las instrucciones de funcionamiento del sistema o en el sistema de ayuda en línea. El formato TDef "7,5 min" da un tiempo para el primer resultado de 18 minutos y un rendimiento de 240 pruebas por hora. La expresión "7,5 min' TDeP" se refiere a un software de definición de prueba que es capaz de aspirar y luego dispensar en tres posiciones secuenciales con un tiempo de incubación de 2,5 min entre las dos adyacentes. La cantidad de testosterona presente en la muestra del paciente es inversamente proporcional a la cantidad de unidades de luminiscencia relativa (RLUs) detectadas por el sistema. Los resultados se calculan a partir de una curva maestra ajustada mediante calibración utilizando calibradores de 2 puntos.

La fuente de los reactivos empleados en el ensayo TSTOII es la siguiente (donde Mab es anticuerpo monoclonal; CMO es carboximetiloxima; Z es zwitterión, que es N,N-Bis(3-aminopropil)metilamonio-1,3-propano sulfonato; AE es éster de acridinio; y DHT es dihidrotestosterona.

Anticuerpo de captura: clon 3,6A3 Mab de Bioventex, Farnham, Surrey, Reino Unido;

Conjugado de biotina: Biotina-LC-3,6A3 Mab;

Conjugado de detección de Hapteno: 3-CMO-5β-dihidro-testosterona;

Conjugado de reactivo Lite: Z-AE-3-CMO-5β-dihidro-testosterona (5β-DHT-Z-AE) (conjugado de biotina, conjugado de detección de hapteno y conjugado de reactivo Lite se preparan por procedimientos de conjugación como se describe en "Antibody as a Tool," J.J. Marchalonis and G.W. Warr (editores), John Wiley (casa editora), September 1982);

Agente de liberación: 2-metoxiestrona de Steraloids Inc.; y

LODESTARS™ micropartículas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina de Varian Inc., Santa Clara CA.

Se prepara una composición de agente de liberación acuoso, que comprende 2-metoxiestrona (0,40 mg/l) regulada a pH 6,0 ± 0,05 con un regulador de solución salina MES. La composición también incluye EDTA de sodio (estabilizador), BSA libre de ácidos grasos (estabilizador/bloqueador), IgG de oveja (bloqueador), PLURONIC® L-64 (surfactante) y Microprotect y sulfato de neomicina (antifúngico, antibacteriano, conservante). Para los fines del formato de ensayo que se realizará en los ensayos a continuación, la composición del agente de liberación también comprende anticuerpo anti testosterona BVX 3,6A3 LC-biotina (20x) como anticuerpo de captura de testosterona (27 mg/l). MES es ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; BSA es albúmina de suero bovino; IgG es inmunoglobulina G; BVX es Mab Bioventex.

El reactivo SP es una composición acuosa que comprende micropartículas LODESTARS™ para la captura de anticuerpo anti testosterona biotinilado (0,33 g/l) en regulador PBS a pH 7,4 ± 0,05. La composición también incluye EDTA de sodio (estabilizador), BSA libre de ácidos grasos y caseinato de sodio (estabilizador/bloqueador), PLURONIC® L-64 (surfactante) y Micro-O-Protect y sulfato de neomicina (antifúngico, antibacteriano, conservante). El reactivo Lite es una composición acuosa que incluye el conjugado de reactivo Lite (36,00 ug/l) regulado con PBS a pH 7,4 ± 0,05. La composición también incluye EDTA de sodio (estabilizador), BSA libre de ácidos grasos y caseinato de sodio (estabilizador/bloqueador), PLURONIC® L-64 (surfactante) y Micro-O-Protect y sulfato de neomicina (antifúngico, antibacteriano, conservante).

Los ensayos se llevan a cabo en un aparato ADVIA CENTAUR®, ADVIA CENTAUR® XP o ADVIA CENTAUR® CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante suministradas con este. Para fines de comparación, también se estudian las siguientes sustancias que se sabe que se enlazan de forma relativamente fuerte a SBHG: 2-mesterolona, androstenediol y 5α-androstan-17α-metil-3a, 17β-diol (metil-3α). Estas sustancias se obtienen de Steraloids Inc. y se sustituyen por 2-metoxiestrona en la formulación anterior para la composición del agente de liberación. Los resultados se resumen en la Tabla 1 a continuación. El multidiluyente 3 es

un diluyente para la muestra y es suero humano despojado de carbón (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Norwood MA).

Tabla 1

Muestra	% de reactividad entrecruzada
2-metoxiestrona	0,001%
5 α -Androstan-17 α -metil-3 α , 17 β -diol	0,013%
Androstenediol	0,076%
2-Mesterolona	0,082%
Multi-Diluyente 3	

5

% de reactividad entrecruzada = (dosis observada – dosis de multi diluyente 3)/concentración objetivo * 100%

Como puede verse, el porcentaje de reactividad entrecruzada entre 2-metoxiestrona y el conjugado anti testosterona 3,6A3 Mab es el menor (0,001%) y el de la 2-mesterolona fue el mayor (0,082%). Solo la 2-metoxiestrona tenía una reactividad entrecruzada con el conjugado de Mab que era menor que el 0,010% de acuerdo con los principios descritos aquí.

10

Los ensayos se llevan a cabo para la testosterona usando el aparato ADVIA CENTAUR® y los reactivos antes mencionados de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el uso del aparato. En la Figura 1 se muestra una curva de calibración de ADVIA CENTAUR® TSTOII. Los reactivos BL4 son reactivos de Lote 4 de Mesa. Para propósitos de comparación, se usan las proporciones de señal del calibrador, % B/Bo. B/Bo es la proporción de la unidad de luminiscencia relativa (RLU) a una ración de dosis dada en relación con 0 ng/ml. La señal de datos obtenida con el uso de 2-metoxiestrona en la composición de agente de liberación es al menos 10-20% inferior que cuando la 2-metoxiestrona no está presente en la composición de agente de liberación, lo que indica que, con la presencia de 2-metoxiestrona, la sensibilidad del ensayo aumenta a medida que se extrae más testosterona del complejo testosterona SHBG. En la señal de ensayo anterior, es inversamente proporcional a la cantidad de testosterona presente en las muestras.

15

20

También se llevan a cabo ensayos para la testosterona usando el aparato y reactivos DIMENSION VISTA® y la tecnología de ensayo LOCI® como se discutió aquí anteriormente. Las quimiperlas son partículas de látex de poliestireno modificado con carboxilo que comprenden un compuesto quimiluminiscente (europio y tioxeno quelado) y se preparan de una manera tal como se describe en las patentes de Estados Unidos Nos. 5,811,311 y 6,406,667. Sensiperlas son partículas de látex de poliestireno modificadas con carboxilo que comprenden un compuesto fotosensibilizador (bis-(trihexil)-silicona-t-butil-ftalocianina) y preparadas usando un método análogo al descrito en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,153,442, 7,022,529, 7,229,842 y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 20050118727A. Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se incuban durante aproximadamente 11 minutos con una composición de agente de liberación acuosa (que contiene 2-metoxiestrona (1,2 μ g/ml) regulada a pH 7,2 (con base Tris 0,1 M, NaCl 0,3 M y EDTA 0,025 M) y una composición de Mab biotinilada acuosa (que comprende Mab biotinilado para testosterona (Clon 3,6A3 Mab de Bioventex Inc.) regulado a pH 7,2 con diluyente de regulador). Luego, una composición acuosa de quimiperla (que contiene TTST quimiperla) regulada a pH 7,2 con diluyente regulador) y una solución acuosa de reactivo Sensiperla para generar señales. El TTST quimiperla es una quimiperla recubierta con 5 β -androstan-17 β -ol-3-ona-3-CHO. La composición del agente de liberación también contiene BSA, gamma globulina bovina (BGG) e IgG de oveja (bloqueadores de proteína), PROCLIN® 300 (surfactante) y Dextrano T-500 y Dextrano 1 (bloqueadores). Los resultados se resumen en la Figura 2. TTST es testosterona total.

25

30

35

También se llevan a cabo ensayos para el estradiol usando el aparato y reactivos DIMENSION VISTA® y la tecnología de ensayo LOCI®. Los reactivos y el procedimiento empleados son los mismos que los aparatos y reactivos DIMENSION VISTA® y la tecnología de ensayo LOCI® descritos anteriormente para el ensayo de testosterona, con la excepción de que el reactivo hapteno comprende estradiol en lugar de testosterona y los anticuerpos de los reactivos de anticuerpos son anticuerpos para estradiol. Los resultados se resumen en la Figura 3. E2 es estradiol.

40

5 Otro ejemplo de un ensayo se lleva a cabo para la testosterona y se realiza usando el aparato ADVIA CENTAUR® y los reactivos expuestos anteriormente para la generación de la curva de calibración de TSTOII de ADVIA CENTAUR® antes mencionada como se representa en la Figura 1, con la excepción de que el agente liberador comprende cantidades diversas de etilenglicol (0%, 5%, 10%, 20% y 40%, respectivamente). Los resultados se resumen en la Figura 4. Los resultados indican que, con un aumento de etilenglicol, la curva de calibración en la región estándar media y superior se extiende más para permitir una determinación más precisa de las concentraciones de testosterona en las muestras. EG es etilenglicol.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un esteroide sexual en una muestra sospechosa de contener un esteroide sexual, el método comprende:
- (a) proporcionar en combinación en un medio:
- 5 (i) la muestra, y
- (ii) 2-alcoxiestróna en una cantidad suficiente para liberar al menos una parte del esteroide sexual de sustancias de enlace en las que el alcoxi tiene de 1 a 5 átomos de carbono,
- (b) incubar el medio bajo condiciones para liberar el esteroide sexual de las sustancias de enlace,
- 10 (c) añadir al medio un sistema de detección que comprende uno o más miembros para detectar el esteroide sexual en el que al menos un miembro es una pareja de enlace específico para el esteroide sexual, y
- (d) examinar el medio por la presencia de un complejo que comprende el esteroide sexual y la pareja de enlace específica para el esteroide sexual, la presencia y/o cantidad del complejo que indica la presencia y/o cantidad del esteroide sexual en la muestra.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la pareja de enlace específica para el esteroide sexual es un anticuerpo.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sistema de detección comprende además un conjugado del esteroide sexual y un marcador.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el marcador es una enzima, isótopo radioactivo, una partícula o un compuesto luminiscente.
- 20 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la pareja de enlace específica para el esteroide sexual está enlazado a una partícula.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el alcoxi es metoxi.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el esteroide sexual es testosterona o estradiol.
- 25 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la combinación comprende además un poliol C₂ a C₆ que comprende 2 o 3 grupos hidroxilo.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el poliol C₂ a C₆ está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 40% en peso.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el poliol C₂ a C₆ es etilenglicol o glicerol.
- 30 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la combinación comprende uno o más miembros del sistema de detección antes de incubar el medio.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la 2-alcoxiestróna está presente en la combinación en una cantidad suficiente para liberar al menos el 90% del esteroide sexual de las sustancias de enlace.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad de 2-alcoxiestróna en la combinación es de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 3% en peso.
- 35 14. Un kit para determinar la presencia y/o la cantidad de un esteroide sexual en una muestra sospechosa de contener el esteroide sexual, el kit comprende:
- (a) un sistema de detección que comprende uno o más miembros para detectar el esteroide sexual en el que al menos un miembro es una pareja de enlace específica para el esteroide sexual, y
- 40 (b) 2-alcoxiestróna en una cantidad suficiente para liberar al menos una parte del esteroide sexual de sustancias de enlace en las que el alcoxi tiene de 1 a 5 átomos de carbono.
15. El kit de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el sistema de detección comprende además un conjugado del esteroide sexual y un marcador.
16. El kit de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el alcoxi es metoxi.
- 45 17. El kit de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende además un poliol C₂ a C₆ que comprende 2 o 3 grupos hidroxilo.

18. El kit de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el poliol C₂ a C₆ es etilenglicol o glicerol.

Figura 1

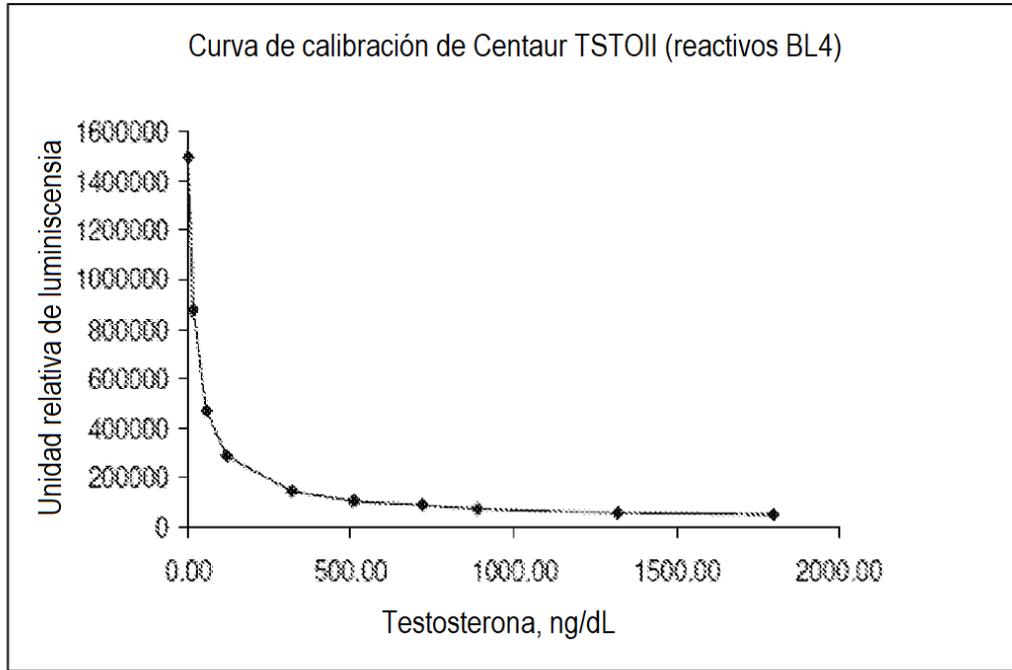


Figura 2

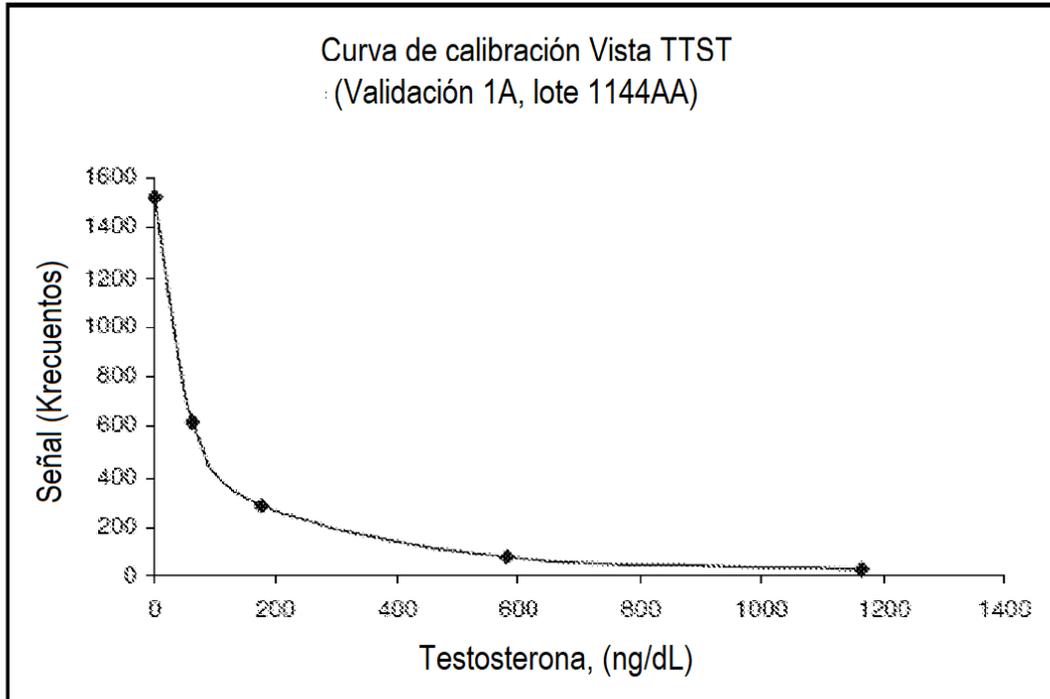


Figura 3

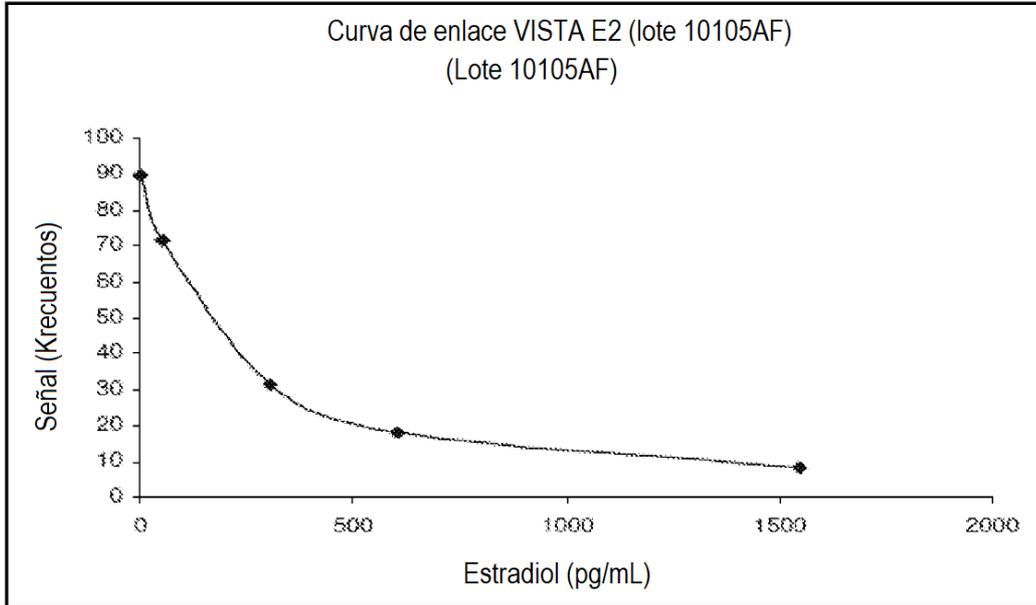


Figura 4

