

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 294**

51 Int. Cl.:

G01N 33/548 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2013** **PCT/US2013/036111**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013** **WO13158454**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2013** **E 13778621 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 2839286**

54 Título: **Compuestos y procedimientos para la preparación de reactivos conjugados**

30 Prioridad:

18.04.2012 US 201261625977 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, US**

72 Inventor/es:

**TENG, ZHU;
GENG, LIPING y
DRINAN, MARTIN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 671 294 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

Compuestos y procedimientos para la preparación de reactivos conjugados

Antecedentes

5 Esta divulgación se refiere a compuestos y procedimientos para la preparación de reactivos conjugados que comprenden un soporte enlazado a un miembro específico de un par de enlazamiento.

En el campo de la medicina y de la química clínica se usan soportes que comprenden uno o más compañeros específicos de enlazamiento; por ejemplo, en ensayos específicos de enlazamiento, purificación de sustancias por afinidad, separación de células, procedimientos enzimáticos y sistemas de administración de medicamentos.

10 Existe una necesidad continua de estrategias para la preparación de tales reactivos conjugados. Por ejemplo, existe una necesidad continua de reactivos conjugados que puedan usarse en ensayos para determinar exactamente la presencia o la cantidad, o ambas, de un analito en muestras en las cuales se sospecha que está contenido el mismo.

Resumen

15 La invención corresponde a una composición y a procedimientos tal como se reivindican. Algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí se dirigen a una composición que comprende un soporte que tiene sobre su superficie al menos una capa interior de polisacárido y una capa exterior de polisacárido, en cuyo caso la capa exterior de polisacárido tiene residuos pendientes que comprenden, cada uno, una funcionalidad de amina terminal. El punto de enlace del residuo pendiente con la capa exterior de polisacárido no comprende un enlace de amida. La composición puede emplearse en un procedimiento para conjugar un miembro de un par específicos de enlazamiento a una partícula. El procedimiento comprende hacer reaccionar la funcionalidad de amina terminal de la composición con el miembro del par específico de enlazamiento, el cual comprende una funcionalidad reactiva con amina.

20 Algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí se dirigen a un procedimiento para formar un conjugado de un hapteno y una partícula donde la partícula comprende una capa interior de polisacárido y una capa exterior de polisacárido que comprende un grupo aldehído. El procedimiento comprende formar un enlace entre el hapteno funcionalizado con una funcionalidad reactiva con amina y el grupo aldehído con un compuesto de enlace que comprende dos grupos terminales de amina. Uno de los grupos terminales de amina reacciona con el grupo aldehído de la capa externa de polisacárido para formar un enlace que no es de amida y el otro de los grupos terminales de amina reacciona con la funcionalidad reactiva con amina del hapteno.

25 Algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí se dirigen a un procedimiento para formar un conjugado de una hormona esteroide y una partícula, donde la partícula comprende una capa interna de aminodextrano y una capa externa de dextrano aldehído. En el procedimiento, los residuos pendientes que comprenden, cada uno, un grupo terminal de amina se forman sobre la partícula haciendo reaccionar grupos amina de un compuesto de enlazamiento, el cual comprende una cadena de alquileo o de poli(éter alquileo) y dos grupos terminales de amina, con grupos aldehído del aldehído de dextrano externo. Un punto de enlazamiento del residuo pendiente con la capa externa de dextrano aldehído no comprende una conexión de enlace de amida. El grupo terminal de amina del residuo pendiente se hace reaccionar con la hormona esteroide que comprende una funcionalidad reactiva con amina para formar el conjugado de la hormona esteroide y las partículas.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 es una representación de un ejemplo de un esquema de reacción para preparar compuestos de conformidad con los principios descritos aquí.

40 Descripción detallada de formas específicas de realización

En algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí, los presentes inventores han descubierto un reactivo universal que puede emplearse en la preparación de conjugados de soportes y miembros de un par específico de enlazamiento (sbp) tales como, por ejemplo, haptenos. El reactivo es universal en el sentido que puede emplearse el mismo reactivo para formar soportes individuales que comprenden cualquiera de una cantidad de miembros diferentes de sbp. El reactivo universal exhibe una eficiencia mejorada de acoplamiento durante un procedimiento de enlace a un miembro de sbp. Los conjugados resultantes del soporte-miembro de sbp pueden emplearse en un ensayo para un analito. Los conjugados demuestran una buena afinidad de enlazamiento entre la porción del miembro de sbp, por ejemplo, del conjugado y un miembro correspondiente de sbp empleado en un ensayo tal como un hapteno, por ejemplo, un anticuerpo para el hapteno, el cual también es un anticuerpo para el analito, dependiendo de un formato de ensayo.

Tal como se ha mencionado antes, algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí se dirigen a una composición que comprende un soporte que tiene sobre su superficie al menos una capa interna de polisacárido y una capa externa de polisacárido, donde la capa externa de polisacárido tiene residuos pendientes que comprenden un grupo terminal de amina. El punto de enlazamiento del residuo pendiente con la capa externa de polisacárido no comprende un enlace de amida. La composición puede emplearse en un procedimiento para conjugar un miembro de un par específico de enlazamiento a una partícula. El procedimiento comprende hacer reaccionar el grupo terminal de amina de la composición con el miembro del par específico de enlazamiento que comprende una funcionalidad reactiva con amina.

El término "soporte" incluye cualquier material hidrofóbico, sólido o fluido, orgánico o inorgánico, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquier cantidad de formas que incluyen, pero no se limitan a, una partícula que incluye una bolita, película, membrana, tubo, pozo, tira, barra, una superficie plana tal como, por ejemplo, una placa, dendrímero, por ejemplo. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede ser o puede no ser suspendible en el medio en el cual se emplea. Ejemplos de soportes de suspendibles son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotas de aceite, células e hidrogeles. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, poli(butirato de vinilo), por ejemplo; ya sean usados por sí mismos o conjuntamente con otros materiales. Otros soportes incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos, particularmente polisacáridos reticulados tales como agarosa, dextrano, celulosa y almidón, por ejemplo.

Cuando el soporte es una partícula, el diámetro promedio de la partícula es de al menos alrededor de 0.02 micras y no más de alrededor de 100 micras. En algunos ejemplos, las partículas tienen un diámetro promedio desde aproximadamente 0.05 micras a aproximadamente 20 micras, o desde aproximadamente 0.3 micras a aproximadamente 10 micras, por ejemplo. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, magnética o no magnética, capaz de hincharse o incapaz de hincharse, porosa o no porosa, preferiblemente de una densidad que se aproxima a la del agua, por lo general desde aproximadamente 0.7 g/mL a aproximadamente 1.5 g/mL, y compuesta 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, streptococcus, Staphylococcus aureus, E. coli, virus, y similares. Las partículas también pueden ser partículas compuestas por polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, vesículas fosfolipídicas, quilomicrones, lipoproteínas y similares. En algunos ejemplos las partículas son partículas de látex.

El término "polisacárido" significa un carbohidrato que contiene tres o más unidades no modificadas o modificadas de monosacárido tales como, por ejemplo, dextrano incluyendo aminodextrano, aldehído-dextrano y carboxidextrano, un ejemplo, almidón, glucógeno, inulina, levano, manano, agarosa, galactano, y polirribosa. El polisacárido puede hidrolizarse a unidades más simples de monosacárido. El término "dextrano" significa un polisacárido que consiste en unidades de glucosa lineales, enlazadas carbono 1 a carbono 6 (98%); una glucosa copolimerizada. El término "aminodextrano" significa un dextrano que tiene múltiples funcionalidades de amina por molécula de dextrano. La expresión "aldehído-dextrano" significa un dextrano que tiene múltiples funcionalidades de aldehído por molécula de dextrano.

Las expresiones "capa interna de polisacárido" y "capa externa de polisacárido" se refieren a la posición relativa de una capa de polisacárido con respecto a otra capa de polisacárido sobre la superficie de un soporte. La capa interna de polisacárido se dispone sobre la superficie de un soporte dentro de la capa externa de polisacárido, aunque la capa externa de polisacárido puede estar o puede no estar dispuesta directamente sobre la capa interna de polisacárido.

La expresión "residuos pendientes que comprenden un grupo terminal amina" se refiere a residuos que comprenden una cadena lineal de átomos, en la cual un átomo de carbono de la cadena comprende un grupo amina. La cadena de átomos, sin contar los átomos de hidrógeno, puede ser desde aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos, o 2 a aproximadamente 75 átomos, o aproximadamente 2 a aproximadamente 50 átomos, o aproximadamente 2 a aproximadamente 40 átomos, o aproximadamente 2 a aproximadamente 30 átomos, o aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos, o aproximadamente 2 a aproximadamente 15 átomos, o aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos, o aproximadamente 3 a aproximadamente 50 átomos, o 3 a aproximadamente 40 átomos, o aproximadamente 3 a aproximadamente 30 átomos, o aproximadamente 3 a aproximadamente 20 átomos, o aproximadamente 3 a aproximadamente 15 átomos, o aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos, o aproximadamente 4 a aproximadamente 30 átomos, o aproximadamente 4 a aproximadamente 20 átomos, por ejemplo, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo. La cantidad de heteroátomos en tales residuos pendientes depende del tamaño del compuesto de enlazamiento y, en algunos ejemplos, la cantidad se encuentra en el intervalo desde 0 a aproximadamente 30, o 1 a aproximadamente 25, o aproximadamente 2 a aproximadamente 20, o aproximadamente 2 a aproximadamente 15, o aproximadamente 2 a aproximadamente 10, o aproximadamente 3 a aproximadamente 10, o aproximadamente 3 a aproximadamente 5, por ejemplo. Los heteroátomos pueden estar en forma de una o más funcionalidades tales, por ejemplo, éter, éster, amida, urea, carbamato, sulfonamida, tioéter, hidrazona, hidrazida, amidina, y éster de fosfato. La cadena lineal puede incluir uno o más átomos ramificados tales como, por ejemplo, átomos terciarios de carbono y dendrímeros.

- En algunos ejemplos, de conformidad con los principios descritos aquí, el residuo pendiente comprende alquileo, el cual se refiere a un radical de hidrocarburo saturado, divalente, ramificado o no ramificado, el cual puede comprender una cadena de átomos de carbono de aproximadamente 2 a aproximadamente 30, o aproximadamente 2 a aproximadamente 25, o aproximadamente 2 a aproximadamente 20, o aproximadamente 2 a aproximadamente 15, o aproximadamente 2 a aproximadamente 10, aproximadamente 2 a aproximadamente 5. En algunos ejemplos el alquileo es, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, 2-metilpropileno, 1,2-dimetilpropileno, butileno, pentileno, hexileno, octileno, nonileno, decileno, por ejemplo. De conformidad con los principios descritos aquí, el residuo pendiente de alquileo comprende un grupo terminal de amina.
- En algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí, el residuo pendiente comprende poli(éter de alquileo), el cual se refiere a enlaces alternantes de éter y residuo de alquileo. La cantidad de enlaces de éter y residuos de alquileo puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 50, o aproximadamente 2 a aproximadamente 40, o aproximadamente 2 a aproximadamente 30, o aproximadamente 2 a aproximadamente 25, o aproximadamente 2 a aproximadamente 20, o aproximadamente 2 a aproximadamente 15, o aproximadamente 2 a aproximadamente 10, aproximadamente 2 a aproximadamente 5. En algunos ejemplos, el alquileo del poli(éter de alquileo) es, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, 2-metilpropileno, 1,2-dimetilpropileno, butileno, pentileno, hexileno, octileno, nonileno, decileno, por ejemplo. En algunos ejemplos el residuo pendiente puede representarse por la fórmula: $-(CH_2CH_2O)_m-$ o $-CH_2(CH_2CH_2O)_m-$ o $-(CH_2CH_2O)_m-CH_2-$ en la cual m es aproximadamente 2 a aproximadamente 30, o aproximadamente 2 a aproximadamente 25, o aproximadamente 2 a aproximadamente 20, o aproximadamente 2 a aproximadamente 15, o aproximadamente 2 a aproximadamente 10, aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o aproximadamente 2 a aproximadamente 4, o aproximadamente 2 a aproximadamente 3, o aproximadamente 3 a aproximadamente 5, o aproximadamente 3 a aproximadamente 4, o aproximadamente 4 a aproximadamente 5. De conformidad con los principios descritos aquí, el residuo pendiente de poli(éter de alquileo) comprende un grupo terminal de amina.
- El punto de enlace del residuo pendiente con la capa externa de polisacárido no comprende un enlace de amida. Esto significa que el enlace del residuo pendiente con la capa externa de polisacárido no comprende un grupo funcional tal como, por ejemplo, $-C(O)NH$ o $-NHC(O)-$. La expresión "punto de enlace" se refiere al punto en el cual una funcionalidad de la capa externa de polisacárido ha reaccionado con una funcionalidad correspondiente del residuo pendiente durante la adhesión del residuo pendiente al polisacárido externo. Por ejemplo, el punto de enlace para un polisacárido externo que comprende grupos aldehído estaría en los grupos aldehído.
- Los miembros de sbp incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, receptores, oligonucleótidos, polinucleótidos, proteínas de enlace de nucleótido, lectinas, haptenos, antígenos, proteínas de enlace de inmunoglobulina, avidina, estreptavidina y biotina, por ejemplo. En algunos ejemplos, el miembro de sbp es una octeno, el cual es un compuesto capaz de enlazarse específicamente con los anticuerpos correspondientes, pero el mismo no actúa como un inmunógeno (o antígeno) para la preparación de los anticuerpos. Pueden prepararse anticuerpos que reconocen un hapteno en contra de compuestos que están comprendidos por el hapteno enlazado con un vehículo inmunogénico (o antigénico). En algunos ejemplos, el hapteno es un hapteno hidrófugo que es un hapteno que es más soluble en un medio hidrófugo que en un medio hidrofílico. El hapteno hidrófugo es soluble en grasas, lo cual significa que el hapteno hidrófugo es soluble en una o más grasas, aceites y lípidos, por ejemplo. En algunos ejemplos, los haptenos hidrófugos incluyen, pero no se limitan a, hormonas esteroides, por ejemplo. Las hormonas esteroides incluyen, a manera de ilustración y no de limitación, progestágenos, estrógenos, andrógenos, glucoesteroides, mineralocorticoides, y secoesteroides, por ejemplo. En algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí, el hapteno hidrófugo es progesterona, testosterona, estriol, estradiol, cortisol, vitamina D, o vitamina B12, por ejemplo.
- Tal como se ha mencionado antes, algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí se dirigen a procedimientos para formar un conjugado de un hapteno, que puede ser un hapteno hidrófugo, y una partícula, donde la partícula comprende una capa interna de polisacárido y una capa externa de polisacárido que comprende un grupo aldehído. El procedimiento comprende formar un enlace entre el hapteno funcionalizado con una funcionalidad reactiva con amina y el grupo aldehído de la capa externa de polisacárido usando un compuesto de enlazamiento que comprende dos grupos terminales de amina. Uno de los grupos terminales de amina reacciona con el grupo aldehído para formar una funcionalidad que no es de amida y el otro de los grupos terminales de amina reacciona con la funcionalidad reactiva con amina. El compuesto de enlazamiento comprende una cadena de alquileo o una cadena de poli(éter de alquileo) donde dos grupos amina están en el extremo de la cadena y, por lo tanto, el compuesto de enlazamiento puede ser denominado compuesto terminal de diamina.
- "Grupo funcional reactivo con amina" significa una funcionalidad que es reactiva con un grupo amina, habitualmente en virtud de la propiedad nucleofílica o básica de la amina tal como, pero no limitada a, un aldehído; un aldehído funcionalizado tal como, por ejemplo, un aldehído funcionalizado con carboximetoxilamina; una cetona; una cetona funcionalizadas tal como, por ejemplo, un ácido α -ceto carboxílico; un grupo epoxi; un alcohol funcionalizado tal como, por ejemplo, un tosilato; por ejemplo.

En un ejemplo de conformidad con los principios descritos aquí, el anterior procedimiento comprende hacer reaccionar el grupo aldehído de la capa externa de polisacárido con uno de los dos grupos terminales de amina del compuesto de enlazamiento para formar una partícula con un residuo pendiente que comprende un grupo terminal de amina, el cual es el otro de los grupos terminales de amina del compuesto de enlazamiento. El grupo terminal de amina del residuo pendiente se hace reaccionar con la funcionalidad reactiva con amina del hapteno para formar el conjugado.

En otro ejemplo de conformidad con los principios descritos aquí, el anterior procedimiento comprende hacer reaccionar uno de los dos grupos terminales de amina del compuesto de enlazamiento con la funcionalidad reactiva con amina del hapteno para formar un hapteno con un residuo que comprende un grupo terminal de amina, el cual es el otro de los dos grupos terminales de amina del compuesto de enlazamiento. El conjugado se forma haciendo reaccionar el grupo aldehído de la capa externa de polisacárido con el grupo terminal de amina del residuo que fue agregado al hapteno.

Algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí son dirigidos a un procedimiento para formar un conjugado de una hormona de esteroide y una partícula, donde la partícula comprende una capa interna de aminodextrano y una capa externa de aldehído-dextrano. El procedimiento comprende formar residuos pendientes sobre la partícula haciendo reaccionar grupos de aldehído del aldehído de dextrano externo con un grupo de amina del compuesto de enlazamiento que comprende una cadena de alquileo o de poli(éter de alquileo) y grupos terminales de amina en cada extremo de la cadena. Un punto de enlace del residuo pendiente con la capa externa de aldehído-dextrano no comprende un enlace de amida. Cada uno de los residuos pendientes comprende un grupo terminal de amina, el cual se hace reaccionar con la hormona de esteroide que comprende una funcionalidad reactiva con amina para formar el conjugado de la hormona de esteroide y la partícula.

En algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí, las partículas comprenden un marcador, la cual es cualquier molécula que produzca o puede inducirse a que produzca una señal y puede ser, a manera de ilustración y no de limitación, un compuesto quimioluminiscente, un sensibilizador, un compuesto fluorescente, un radio-marcador o una enzima, por ejemplo.

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 visible y ultravioleta, donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitado. Esta energía absorbida se disipa luego mediante emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otros marcadores que producen directamente una señal incluyen isótopos radioactivos y tintes.

Como alternativa, el marcador puede necesitar otros componentes para producir una señal. El marcador, junto con tales otros componentes, comprende un sistema de producción de señal (sps), el cual incluiría todos los componentes requeridos para producir una señal medible. Tales otros componentes incluyen, pero no se limitan a, sustratos, coenzimas, neutralizantes, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, barredores, iones de metal y una sustancia de enlazamiento específica requerida para enlazar sustancias que generan señales.

Marcadores adecuados incluyen, a manera de ilustración y no de limitación, tintes, fluorescentes tales como fluoresceína, compuestos de roda amina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído, quelatos fluorescentes de tierras raras y fluorescamina; quimioluminiscentes tales como isoluminol, y compuestos de acridinio; sensibilizadores tales como eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, hematoporfirina, ftalocianinas, clorofila, rosa de Bengala; por ejemplo. "Sistema de producción de señal", tal como se usa aquí, significa uno o más componentes, al menos un componente que es un marcador detectable, el cual 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 con el compuesto que se está detectando. El marcador puede asociarse al soporte mediante enlazamiento directo o indirecto, adsorción, absorción, incorporación o solución, por ejemplo.

En algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí, el soporte es una partícula de látex. En algunos ejemplos, la partícula de látex comprende un marcador que se incorpora a la partícula de látex. En algunos ejemplos, el marcador es una composición quimioluminiscente o una composición de sensibilizador, por ejemplo. En algunos ejemplos, el hapteno hidrófugo del reactivo conjugado se selecciona del grupo que consiste en progestágenos, estrógenos, andrógenos, glucoesteroides, mineralocorticoides, y secoesteroides, por ejemplo.

Preparación de reactivos conjugados

Ejemplos de síntesis de reactivos conjugados se describen con referencia a la Fig. 1 a modo de ilustración y no de limitación. Pueden emplearse otras estrategias para formar los reactivos conjugados que consistentes con los principios descritos aquí. En el ejemplo representado en la Fig. 1, una partícula de látex 1 (EPRM) que ha incorporado allí un compuesto quimio luminiscente (tinte) y que tiene una capa interna de aminodextrano (Amdex) y una capa externa de aldehído-dextrano (Dexal) se prepara mediante un procedimiento similar a aquel descrito en la patente estadounidense No. 7,179,660. Los grupos aldehído sobre la capa externa de aldehído-dextrano se hacen reaccionar con etilendiamina 2 en condiciones de aminación reductiva para formar el reactivo 3 (EPRMEDA) que tiene residuos

pendientes que comprenden una cadena de etileno y un grupo terminal de amina. Las condiciones de aminación reductiva incluyen el uso de un agente reductor tal como, por ejemplo, un hidruro de metal (por ejemplo, borohidruro de sodio o borohidruro de potasio), cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio. La reacción se lleva a cabo en un medio acuoso a una temperatura durante la reacción de aproximadamente 20°C a aproximadamente 100°C, o aproximadamente 30°C a aproximadamente 50°C, durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas, o aproximadamente 5 horas a aproximadamente 24 horas. El punto de enlace 3a de los residuos pendientes con la capa externa de aldehído-dextrano comprende un enlace secundario de amina.

El reactivo 3 se hace reaccionar con estradiol 4 activado con carboximetoxilamina para formar reactivo conjugado 5 que tiene estradiol enlazado a la partícula de látex 1. La reacción se lleva a cabo combinando primero estradiol 4 activado con carboximetoxilamina con un agente de activación tal como, por ejemplo, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) en un medio acuoso a una temperatura de aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C, o aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, o a temperatura ambiente durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 5 horas, o aproximadamente 1 hora a aproximadamente 3 horas antes de la adición del reactivo 3. Después de la adición del reactivo 3, el medio es agitado a aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 40°C, o aproximadamente 200°C hasta aproximadamente 30°C, o a temperatura ambiente por un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas, o aproximadamente 5 horas a aproximadamente 24 horas.

Descripción general de ensayos que utilizan los presentes conjugados

Ejemplos de conjugados de soporte-miembro de sbp que se preparan de conformidad con los principios descritos aquí pueden emplearse como un reactivo marcador en ensayos para la determinación de un analito en una muestra.

Un ensayo puede realizarse sin separación (homogéneo) o con separación (heterogéneo) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los ensayos heterogéneos habitualmente incluyen una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos pueden incluir reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que incluyen reactivos no marcados habitualmente comprenden la formación de complejos relativamente grandes que incluyen uno o más anticuerpos preparados a partir de conjugados inmunogénicos de conformidad con los principios descritos aquí. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, procedimientos de inmunoprecipitación y aglutinación y técnicas de dispersión lumínica tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpo. Los inmunoensayos marcados incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayos de enzima, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayos, ensayos de inhibición, ensayos de luminiscencia inducida y ensayos de canalización de oxígeno fluorescentes, por ejemplo, donde un conjugado de marcador de conformidad con los principios descritos aquí se emplea en el ensayo.

Un grupo general de inmunoensayos incluye inmunoensayos que usan una concentración limitada del presente reactivo conjugado. Otro grupo de inmunoensayos incluye el uso de un exceso de uno o más de los reactivos principales tales como, por ejemplo, un exceso del presente reactivo conjugado. Otro grupo de inmunoensayos son ensayos homogéneos sin separación en los cuales un reactivo marcado de conformidad con los principios descritos aquí modula la señal de marcador al enlazar el presente conjugado con un anticuerpo en la muestra.

Tal como se ha mencionado antes, los ensayos pueden realizarse sin separación (homogéneos) o con separación (heterogéneos) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los inmunoensayos homogéneos son ejemplificados por medio del ensayo de EMIT® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL) divulgado en Rubenstein, et al., patente estadounidense No. 3,817,837, columna 3, renglón 6 a columna 6, renglón 64; procedimientos de inmunofluorescencia tales como aquellos descritos en Ullman, et al., patente estadounidense No. 3,996,345, columna 17, renglón 59, a columna 23, renglón 25; inmunoensayos de canalización de enzima ("ECIA") tales como aquellos divulgados en Maggio, et al., patente estadounidense No. 4,233,402, columna 6, renglón 25 a columna 9, renglón 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") tal como se divulga, por ejemplo, entre otros, en la patente estadounidense No. 5,354,693; y inmunoensayos tales como el ensayo por inmunoabsorción enlazado con enzima ("ELISA"). Ejemplos de ensayos heterogéneos son los radioinmunoensayos, divulgados en Yalow, et al., J. Clin. Invest. 39:1157 (1960). Las porciones relevantes de las divulgaciones anteriores se incorporan todas al presente documento por medio de referencia.

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

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partícula de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de tinte disperso ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); el inmunoensayo de membrana enzimática ("EMIA"); luminoimunoensayos ("LIA"); etc. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensor que incluyen el monitoreo de los cambios en las

propiedades ópticas, acústicas y eléctricas del presente conjugado al enlazarse a un anticuerpo. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensor óptico, ensayos de inmunosensor acústico, ensayos de inmunosensor semiconductor, ensayos de inmunosensor transductor, ensayos de inmunosensor potenciométrico, ensayos de electrodo amperométrico.

5 Los ensayos heterogéneos habitualmente incluyen una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Una variedad de formatos de ensayos heterogéneos, competitivos y no competitivos se divulgan en Davalian et al., patente estadounidense No. 5,089,390, columna 14, renglón 25 a columna 15, renglón 9, incorporada al presente documento mediante referencia. En un ejemplo de un ensayo heterogéneo competitivo, se pone en
10 contacto un soporte que tiene un anticuerpo para un analito enlazado al mismo con un medio que contiene la muestra sospechada de contener el analito y un conjugado marcado de conformidad con los principios descritos aquí. El analito en la muestra compete con el presente conjugado que tiene el marcador detectable por enlazarse al anticuerpo para el analito. Después de separar el soporte y el medio, la actividad del marcador del soporte o el medio se determina mediante técnicas convencionales y se relaciona con la cantidad de analito en la muestra.

15 En algunos ejemplos, una muestra que va a analizarse se combina en un medio de ensayo con un anticuerpo para el analito y el conjugado marcado de conformidad con los principios descritos aquí. El medio es examinado para la presencia o la cantidad o ambas de un complejo que comprende analito y el anticuerpo para el analito donde la presencia y/o la cantidad de tal complejo indica la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.

20 La muestra que va a analizarse es una de la cual se sospecha que contiene un analito, es decir el compuesto de interés. Las muestras se toman preferiblemente de un sujeto mamífero, por ejemplo, humanos u otras especies animales e incluyen fluidos biológicos tales como sangre entera, suero, plasma, esputo, fluido linfático, semen, moco vaginal, heces, orina, fluido espinal, saliva, de posición, fluido cerebral espinal, lágrimas, moco y similares; tejido biológico tal como cabello, piel, secciones de tejidos o tejidos extirpados de órganos u otras partes del cuerpo; etc. en muchos casos, la muestra es sangre entera, plasma o suero.

25 La muestra puede prepararse en cualquier medio conveniente. De manera conveniente, la muestra puede prepararse en un medio de ensayo, el cual se discute más completamente en lo sucesivo. En algunos casos puede aplicarse un tratamiento previo a la muestra tal como, por ejemplo, para lisar células sanguíneas. En algunos ejemplos, tal tratamiento previo se realiza en un medio que no interfiere a continuación con un ensayo.

30 Los ensayos se realizan normalmente un medio acuoso con un pH regulado a un pH moderado, que en términos generales proporciona una sensibilidad óptima al ensayo. El medio acuoso puede ser solamente agua o puede incluir desde 0.1 a aproximadamente 40 por ciento en volumen de un co-solvente. El pH para el medio 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. El pH habitualmente será un compromiso entre un enlazamiento óptimo de los miembros de enlazamiento de cualquier par específico de enlazamiento, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, tales como miembros del sistema de producción de señal, etc. Pueden usarse diversos
35 reguladores de pH para alcanzar el pH deseado y mantener el pH durante el ensayo. Los reguladores de pH ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbitol, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINE y similares. El regulador particular de pH que se emplee no es crítico, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro regulador de pH.

40 Pueden emplearse diversos materiales complementarios en los procedimientos de ensayo. Por ejemplo, además de los reguladores de pH, el medio puede comprender estabilizantes para el medio y para los reactivos empleados. En algunas formas de realización, además de estos aditivos pueden incluirse proteínas tales como albúminas; disolventes orgánicos tales como formamida; sales de amonio cuaternario; poli aniones tales como sulfato de dextrano; potenciadores de enlazamiento, por ejemplo, polialquilenglicoles; polisacáridos tales como dextrano, trehalosa, o similares. El medio también puede comprender agentes para impedir la formación de coagulo de sangre. Tales agentes
45 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 tal como se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, azida de sodio, sulfato de neomicina, PROCLIN® 300, estreptomycin, y similares. Cualquiera de los materiales anteriores, si se emplean, se encuentra presente en una concentración o una cantidad suficientes para lograr el efecto o función deseados.

50 Dependiendo de la naturaleza del ensayo empleado, el medio puede comprender uno o más componentes tales como, por ejemplo, otros miembros de un sistema de producción de señal del cual el marcador es una parte.

Pueden aplicarse al medio uno o más período de incubación, a uno o más intervalos que incluyen cualquier intervalo entre adiciones de diversos reactivos empleados en un ensayo que incluye aquellos mencionados anteriormente. El medio se incuba habitualmente a una temperatura y por un tiempo suficiente para que ocurra un enlazamiento de
55 diversos componentes de los reactivos y un enlazamiento del analito en la muestra. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el procedimiento y habitualmente temperatura constante, preferiblemente temperatura ambiente, durante el período de la medición. En algunos ejemplos, las temperaturas de incubación están en un intervalo desde aproximadamente 5° a aproximadamente 99°C, o desde aproximadamente 15°C a

aproximadamente 70°C, o aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C. El período de tiempo para la incubación en algunos ejemplos es de aproximadamente 0.2 segundos hasta aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 segundo hasta aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 2 segundos hasta aproximadamente 1 hora, o aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 15 minutos. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de enlazamiento de los diversos reactivos, la cual se determina mediante la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de enlazamiento y la constante de velocidad de disociación.

En un ejemplo de un procedimiento para determinar un analito en una muestra sospechosa de contener el analito se proporciona una combinación en un medio donde la combinación incluye la muestra, un anticuerpo para el analito, y un conjugado de marcador de conformidad con los principios descritos aquí. El medio se examina para la presencia o para la cantidad, o para ambas, de un complejo que comprende el analito y el anticuerpo para el analito. La presencia y/o la cantidad del complejo indica la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.

Algunos ensayos conocidos utilizan un sistema de producción de señal (sps) que emplea primeros y segundos miembros de sps. La designación "primero" y "segundo" es completamente arbitraria y no significa que sugiera un orden alguno o clasificación entre los miembros de sps en los presentes procedimientos. Los miembros de sps pueden relacionarse en que la activación de un miembro del sps produce un producto tal como, por ejemplo, luz, lo cual da lugar a la desactivación de otro miembro del sps.

En algunas formas de realización de ensayos conocidos, los miembros de sps comprenden un sensibilizador tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador y una composición quimioluminiscente donde la activación del sensibilizador da lugar a un producto que activa la composición quimioluminiscente. El segundo miembro de sps usualmente genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad del miembro de sps enlazado y/o no enlazado, es decir la cantidad de miembro de sps enlazado o no enlazado al analito que se está detectando o a un agente que refleja la cantidad del analito que va a detectarse. En algunos ejemplos de conformidad con los principios descritos aquí, uno del reactivo sensibilizador o del reactivo quimioluminiscente es un reactivo conjugado, preparado de conformidad con los principios descritos aquí. Ejemplos de fotosensibilizadores y reactivos quimioluminiscentes que pueden utilizarse son aquellos descritos en las patentes estadounidenses Nos. 5,340,716 y 6,251,581, cuyas divulgaciones relevantes se incorporan al presente documento mediante referencia.

En un ejemplo particular, puede emplearse un inmunoensayo de luminiscencia inducida. El inmunoensayo de luminiscencia inducida es referido en la patente estadounidense No. 5,340,716 (Ullman), cuya divulgación se incorpora al presente documento mediante referencia. El ensayo emplea un reactivo fotosensibilizador y un reactivo quimioluminiscente. En una estrategia, el ensayo usa en calidad de reactivo fotosensibilizador un conjugado de partícula de marcador donde el marcador del conjugado de partícula es un fotosensibilizador y donde el conjugado de partícula de marcador es conforme con los principios descritos aquí. El reactivo quimioluminiscente comprende un anticuerpo para el analito. El analito compete con el conjugado de partícula el cual comprende un analito en forma del hapteno del conjugado, para el anticuerpo para el analito. Si el analito se encuentra presente, menos es la cantidad de moléculas de conjugado de partícula de marcador que se aproxima cerca al compuesto quimioluminiscente. Por lo tanto, habrá un decrecimiento en la señal del ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el reactivo quimioluminiscente cuando los dos marcadores se encuentran en proximidad cercana. El reactivo quimioluminiscente activado produce a continuación luz. La cantidad de luz producida se relaciona con la cantidad del complejo formado, el cual a su vez se relaciona con la cantidad de analito presente en la muestra.

En otro ejemplo particular de un inmunoensayo de luminiscencia inducida, el ensayo usa en calidad de un reactivo quimioluminiscente un conjugado de partícula de marcador de conformidad con los principios descritos aquí, donde el marcador del conjugado de partícula es un compuesto quimioluminiscente. El reactivo fotosensibilizador comprende un anticuerpo para el analito. El analito compete con el conjugado de partícula para enlazarse al anticuerpo para el analito. Si el analito está presente, es menor la cantidad de moléculas de conjugado de partícula de marcador que se aproximan cerca al reactivo fotosensibilizador. Por lo tanto, habrá un decrecimiento en la señal de ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente cuando los dos marcadores se encuentran en una proximidad cercana. El compuesto quimioluminiscente activado produce a continuación luz. La cantidad de luz producida se relaciona a la cantidad del complejo formado el cual a su vez se relaciona a la cantidad de analito presente en la muestra.

La concentración del analito que puede ensayarse varía generalmente desde aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-17} M, más habitualmente desde aproximadamente 10^{-6} hasta aproximadamente 10^{-14} M. Consideraciones tales como si el ensayo es cualitativo, semi-cuantitativo o cuantitativo (en relación con la cantidad del analito presente la muestra), la técnica particular de detección y la concentración esperada del analito normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo se determinarán en términos generales por 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 de manera empírica para optimizar la sensibilidad del ensayo en el intervalo de interés. Es decir, una variación en la concentración de analito que es de importancia debe proporcionar una diferencia de señal exactamente medible. 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.

Tal como se ha mencionado antes, la muestra y los reactivos se proporcionan en combinación en el medio. Mientras que el orden de la adición al medio puede variar, habrá algunas preferencias para algunas formas de realización de los formatos de ensayo descritos aquí. El orden más simple de adición es, por supuesto, adicionar todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene sobre la señal como en un ensayo homogéneo. De modo alternativo, cada uno de los reactivos o grupos de reactivos pueden combinarse secuencialmente. En algunas formas de realización puede incluirse una etapa de incubación después de cada adición tal como se ha discutido antes. En ensayos heterogéneos también pueden emplearse etapas de lavado después de una o varias etapas de incubación.

Etapa de examen

En una siguiente etapa de un procedimiento de ensayo, el medio es examinado para la presencia de un complejo que comprende el analito y el anticuerpo para el analito. La presencia y/o la cantidad del complejo indica la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.

La expresión "medir la cantidad de un analito" se refiere a la determinación cuantitativa, semi-cuantitativa y cualitativa del analito. Los procedimientos que son cuantitativos, semi-cuantitativos y cualitativos, así como también todos los otros procedimientos para determinar el analito, se consideran procedimientos de medición de la cantidad del analito. Por ejemplo, un procedimiento que sólo detecta la presencia o ausencia del analito en una muestra sospechosa de contener el analito es considerado incluido dentro del alcance de la presente invención. Los términos "detectar" y "determinar", así como también otros sinónimos comunes para medir, son contemplados dentro del alcance de la presente invención.

En muchas formas de realización, el examen del medio incluye la detección de una señal proveniente del medio. La presencia y/o la cantidad de la señal se relaciona con la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza del sps. Tal como se ha discutido antes, existen numerosos procedimientos por medio de los cuales un marcador de un sps puede producir una señal detectable por medios externos. La activación de un sistema de producción de señal depende de la naturaleza de los miembros del sistema de producción de señal.

Las temperaturas durante las mediciones por lo general se encuentran en el rango desde aproximadamente 10°C a aproximadamente 70°C o desde aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C, o aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C. En una estrategia se forman curvas estándar usando concentraciones conocidas del analito. También pueden usarse calibradores y otros controles.

La luminiscencia o la luz producida a partir de cualquier marcador puede medirse visualmente, fotográficamente, de modo actinométrico, espectrofotométrico, usando un fotomultiplicador o un fotodiodo o mediante cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad del mismo, el cual se relaciona con la cantidad de analito en el medio. El examen de la presencia y/o la cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que por lo general es sólo una etapa en la cual 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, pero no se limitan a, un espectrofotómetro, fluorómetro, espectrómetro de absorción, luminómetro y quimioluminómetro, por ejemplo.

Kits que comprenden reactivos para efectuar ensayos

Los conjugados de soporte marcados tales como, por ejemplo, conjugados de partícula marcados, de conformidad con los principios descritos aquí y otros reactivos para efectuar un ensayo particular para un analito pueden estar presentes en un kit útil para efectuar de modo conveniente un ensayo para la determinación de un analito. El kit puede incluir además otros reactivos para realizar el ensayo, cuya naturaleza depende del formato particular de ensayo.

Los reactivos pueden estar, cada uno, en contenedores separados o pueden combinarse diversos reactivos en uno o varios contenedores, dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos empacados por separado para efectuar un ensayo, tales como miembros adicionales de sbp, miembros de sps, reactivos complementarios, por ejemplo.

Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits puede variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimizan sustancialmente las reacciones que necesitan que ocurran durante los presentes procedimientos y, además, para optimizar sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más reactivos en el kit pueden proporcionarse en forma de un polvo seco, habitualmente liofilizado, incluyendo excipientes, los cuales al disolverse proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para efectuar un procedimiento o un ensayo usando un conjugado de partícula de marcador de conformidad con los principios descritos aquí. El kit puede incluir, además, una descripción descrita de un procedimiento que utiliza reactivos que incluyen un conjugado de conformidad con los principios descritos aquí.

La expresión "al menos", tal como se usa aquí, significa que la cantidad de objetos especificados puede ser igual a o más grande que la cantidad declarada. La expresión "aproximadamente", tal como se usa aquí, significa que la cantidad declarada puede diferir en más o -10%; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un intervalo de 4.5 a 5.5.

- 5 La siguiente discusión se dirige a ejemplos específicos de conformidad con los principios descritos aquí a manera de ilustración y no de limitación; los ejemplos específicos no están destinados a limitar el alcance de la presente divulgación y las reivindicaciones adjuntas. Las numerosas modificaciones y composiciones, procedimientos y sistemas alternativos pueden ser concebidos sin apartarse del espíritu y alcance de la presente divulgación.

EJEMPLOS

- 10 A menos que se indique de otra manera, los materiales en los siguientes experimentos pueden comprarse en Sigma-Aldrich Chemical Corporation, St. Louis MO.

Definiciones:

hr = hora(s)

rpm = revoluciones por minuto

mg = miligramo(s)

- 15 ng = nanogramo(s)

pg = pictogramo(s)

g = gramo(s)

mL = mililitro(s)

°C = grados centígrados

- 20 min = minuto(s)

sec = segundo(s)

conc = concentrado(a)

DI = agua destilada

MES = ácido 2-(N-morfolino)etanesulfónico

- 25 EDA = etilenediamina

NHS = N-hidroxisuccinimida

MeOP = 1-metoxi-2-propanol

PEO4 = poli(óxido de etileno) con cuatro unidades de óxido de etileno que se repiten

UPA = ultra analizador de partículas

- 30 DTT = ditiotreititol

Me = metilo

Et = etilo

Ac = acetato

kDa = kilodalton(s)

- 35 TLC = cromatografía de capa delgada

Rf = factor de retraso

kconteo = kiloconteos

Preparación de bolitas de EPRM-EDA:

Bolitas de EPRM (2000 mg, 20.0 mL) se adicionan a un vial de 40-mL. Las bolitas de EPRM se preparan mediante un procedimiento similar al descrito en la patente estadounidense No. 7,179,660 y el compuesto quimioluminiscente es 2-(4-(N,N, di- tetradecil)-anilino-3-fenil tioxeno con quelato de europio. EDA (800 mg, 890 µl) se combina con 10 mL de regulador de pH MES pH 6 (el "regulador de pH") y aproximadamente 4.2 mL de HCl de 6N. El pH de la mezcla es, o se ajusta a, aproximadamente 6.9. La solución de EDA se adiciona a las bolitas de EPRM sometiendo a vórtex y la mezcla es sacudida a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se combina cianoborohidruro (400 mg) en un vial de 15 ml con 10 ml de agua desionizada y la combinación se adiciona a la anterior mezcla de bolitas. La mezcla se agita a 37 °C durante 18-20 horas. Las bolitas se transfieren a seis tubos de centrifuga de 40 ml. El regulador de pH MES se adiciona para llevar el volumen a 35 ml y la mezcla se centrifuga a 19000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante es decantado y las bolitas son re-suspendidas en 2 ml del regulador de pH con una barra para revólver y se adiciona regulador de pH adicional a 35 ml. La mezcla se somete a sonicación a 18 W de potencia durante 30 segundos, usando hielo para mantener fría la mezcla. La etapa de lavado/sonicación se lleva a cabo 4 veces para retirar todos los químicos de activación. Después de la última centrifugación de regulador de pH MES, se adicionan 2 ml de un regulador de pH que contiene 5% de MeOP y 0.1% de TWEEN® 20 (el "segundo regulador de pH") a los tubos para la etapa de re-suspensión. El segundo regulador de pH adicional se adiciona a 35 ml antes de sonicación. La suspensión de bolitas es centrifugada a 19000 rpm durante 30 minutos. Se descarta el sobrenadante. La sonicación final uso 12 ml del segundo regulador de pH en cada tubo para dar una dilución de 25 mg/ml. El tamaño de partícula es de 277 nm tal como se determina en un instrumento UPA (Microtrac Inc., Montgomeryville PA).

Acoplamiento de las bolitas de EPRM-EDA con éster Estriol-6-CMO NHS

Se prepara CMO esteroide activado adicionando a un vial de 2 ml 5.0 mg de estriol-6-CMO, EDAC (12 mg) y NHS (16 mg) más 1.25 mL de acetonitrilo seco. Los contenidos del vial son sometidos a vórtex de manera vigorosa. La mezcla se deja revolver a temperatura ambiente durante 120 minutos. TLC (EtOAc:EtOH =3:1) indica que no hay un material esteroide de inicio. Rf (éster de NHS) = 0.8; Rf (6-cetoestriol-6-CMO) = 0.05. El CMO esteroide activado se acopla a las bolitas de EPRM-EDA adicionando a un vial de 25 ml, gota a gota mientras se revuelve, 16 ml (400 mg) de suspensión de bolitas anterior, 4.32 mg (1.08 mL) de CMO de estriol activado anterior. Después de completar la adición, la mezcla se revuelve durante 20 horas a temperatura ambiente. Las bolitas resultantes se lavan transfiriendo la mezcla anterior a un tubo de centrifuga de 40 ml. Se adiciona el segundo regulador de pH para llevar los tubos a 35 ml. La centrifugación se lleva a cabo a 19000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante es decantado y las bolitas son re-suspendidas en 10 ml del segundo regulador de pH con una barra para revólver. Se adiciona el segundo regulador de pH a 35 ml. Los tubos son sometidos a sonicación a 18 W de potencia durante 60 segundos usando hielo para mantener los tubos fríos. Las bolitas son centrifugadas tal como se dijo antes y se lavan tres veces adicionales con el segundo regulador de pH. Las bolitas son re-suspendidas en regulador de pH de lavado de hapteno (HEPES de 50 mM, NaCl de 300 mM, EDTA de 1 mM, sulfato de neomicina al 0.01%, TRITON® 405X al 0.1% y PROCLIN® 300 al 0.15%, pH 7.2) por 2 lavadas más. La re-suspensión final usa 10 ml para dar 10 mg/mL de suspensión y se somete a sonicación durante 30 segundos. Se determina un tamaño de partícula de aproximadamente 275 nm en el instrumento UPA. Las bolitas resultantes se designan como bolitas de EPRM-EDA-Estradiol.

Ensayo para el analito estriol

Los ensayos se llevaron a cabo en un analizador DIMENSION® VISTA® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL) siguiendo el protocolo del fabricante para un ensayo de luminiscencia inducida y usando soluciones de muestra que contienen diversas cantidades de estradiol. En este ejemplo, en calidad de reactivo quimioluminiscente, el ensayo usa un conjugado de partícula de marcador de conformidad con los principios descritos aquí donde el marcador del conjugado de partícula es un compuesto quimioluminiscente. El reactivo fotosensibilizador comprende un anticuerpo para el analito en virtud del enlazamiento de partícula de sensibilizador de estreptavidina con el anticuerpo biotinilado. El analito compite con el conjugado de partícula para enlazarse al anticuerpo para el analito. Si el analito está presente, la menor cantidad de moléculas de conjugado de partícula marcado se aproximan cerca al reactivo fotosensibilizador. Por lo tanto, habrá un decrecimiento en la señal de ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente cuando los dos marcadores se encuentran en proximidad cercana. El compuesto quimioluminiscente activado produce a continuación luz. La cantidad de luz producida se relaciona con la cantidad del complejo formado, el cual a su vez se relaciona con la cantidad de analito presente en la muestra.

La bolita de sensibilizador de estreptavidina ("sensibolita") se prepara usando un procedimiento análogo que el descrito en las patentes estadounidenses Nos. 6,153,442, 7,022,529, 7,229,842 y la publicación de la solicitud de patente estadounidense No. 20050118727A. El fotosensibilizador fue bis-(trihehil)-silicio-t-butiltfalocianina. El EPRM-EDA-Estriol preparado tal como se ha descrito antes fue empleado como un "reactivo de quimiobolita". El reactivo de anticuerpo biotinilado se prepara usando anticuerpo monoclonal específico para estriol (monoclonal de oveja de Bioventix, Farnham, Surrey, Reino Unido) y biotinilando grupos amina del anticuerpo mediante reacción con NHSPEO4-biotina (Pierce Chemical Company, Rockford IL) de una manera similar a la descrita en la publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2009/0258435A1, cuyas porciones relevantes se incorporan al presente documento mediante referencia.

5 En el momento de tiempo $t = \text{cero seg}$, fueron adicionados 20 μl de reactivo de anticuerpo biotinilado y 20 μl de agua a un recipiente de reacción. Fue adicionado la muestra, 12 μl , 21.6 segundos más tarde, seguida por 8 μl de agua. A $t = 414.0$ segundos, fueron adicionados 40 μl de reactivo de quimio-bolita seguidos por 20 μl de agua. Después el reactivo de sensibiliza fue expuesto a los 457.2 segundos. Se hicieron mediciones 601.2 segundos después de iniciar la secuencia de reacción.

Los resultados se recopilan en la tabla 1 más adelante.

Tabla 1

Estriol (pg/mL)	Kconteo
0.00	1491
50.5	1136
320.6	424
652.8	213
1585.5	84

10 Los experimentos anteriores se repiten usando un procedimiento similar al descrito anteriormente y usando, en calidad de hapteno hidrófugo, progesterona, testosterona, y vitamina D. Los resultados para progesterona se recopilan en la tabla 2.

Tabla 2

Progesterona (ng/mL)	kconteo
0.00	676
0.97	487
8.97	108
17.2	53
39.4	22

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un soporte hidrofinsoluble, que tiene sobre su superficie al menos una capa interna de aminodextrano y una capa externa de aldehído-dextrano, donde la capa externa de aldehído-dextrano tiene residuos pendientes que comprenden, cada uno, un grupo terminal de amina, en cuyo caso un punto de enlazamiento de cada uno de los residuos pendientes con la capa de aldehído-dextrano comprende un enlazamiento secundario de amina, pero no comprende un enlace de amida, y donde cada uno de los residuos pendientes comprende un alquileo de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono o un poli(éter de alquileo) de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 enlaces de éter y residuos de alquileo que se alternan.
2. La composición según la reivindicación 1 en la cual el soporte es una partícula.
3. La composición según la reivindicación 1 en la cual el residuo pendiente comprende un alquileo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 átomos de carbono o un poli(éter de alquileo) de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 enlaces de éter y residuos de alquileo que se alternan.
4. Un procedimiento de conjugar un miembro de un par específico de enlazamiento a un soporte, y el procedimiento hacer reaccionar el grupo terminal de amina de la composición de la reivindicación 1 con el miembro del par específico de enlazamiento que comprende una funcionalidad reactiva con amina.
5. El procedimiento según la reivindicación 4 en el cual el miembro del par específico de enlazamiento es un hapteno.
6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el cual el hapteno es una hormona.
7. Un procedimiento para formar un conjugado de un hapteno y la composición de la reivindicación 1, y el procedimiento comprende formar un enlace entre el hapteno funcionalizado con una funcionalidad reactiva con amina y un grupo terminal amina de un residuo pendiente de la composición.
8. Un procedimiento para formar un conjugado de una hormona esteroide y una partícula hidrofinsoluble, en el cual la partícula comprende una capa interna de aminodextrano y una capa externa de aldehído-dextrano, y el procedimiento comprende: formar una composición de la reivindicación 1 y hacer reaccionar el grupo terminal de amina del residuo pendiente con la hormona esteroide que comprende una funcionalidad reactiva con amina para formar el conjugado de la hormona esteroide y la partícula.
9. El procedimiento según la reivindicación 8 en el cual las partículas son partículas de látex o en el cual las partículas comprenden un marcador, en el cual el marcador se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en composiciones quimioluminiscentes y composiciones sensibilizadoras, o en el cual la hormona esteroides se selecciona del grupo que consiste en progestágenos, estrógenos, andrógenos, glucoesteroides, mineralocorticoides, y secoesteroides.
10. El procedimiento según la reivindicación 8 en el cual la funcionalidad reactiva con amina de la hormona esteroide es una cetona funcionalizada, un aldehído funcionalizado o un alcohol funcionalizado.
11. El procedimiento según la reivindicación 8 en el cual la funcionalidad reactiva con amina de la hormona esteroide es carboximetoxilamina funcionalizada.

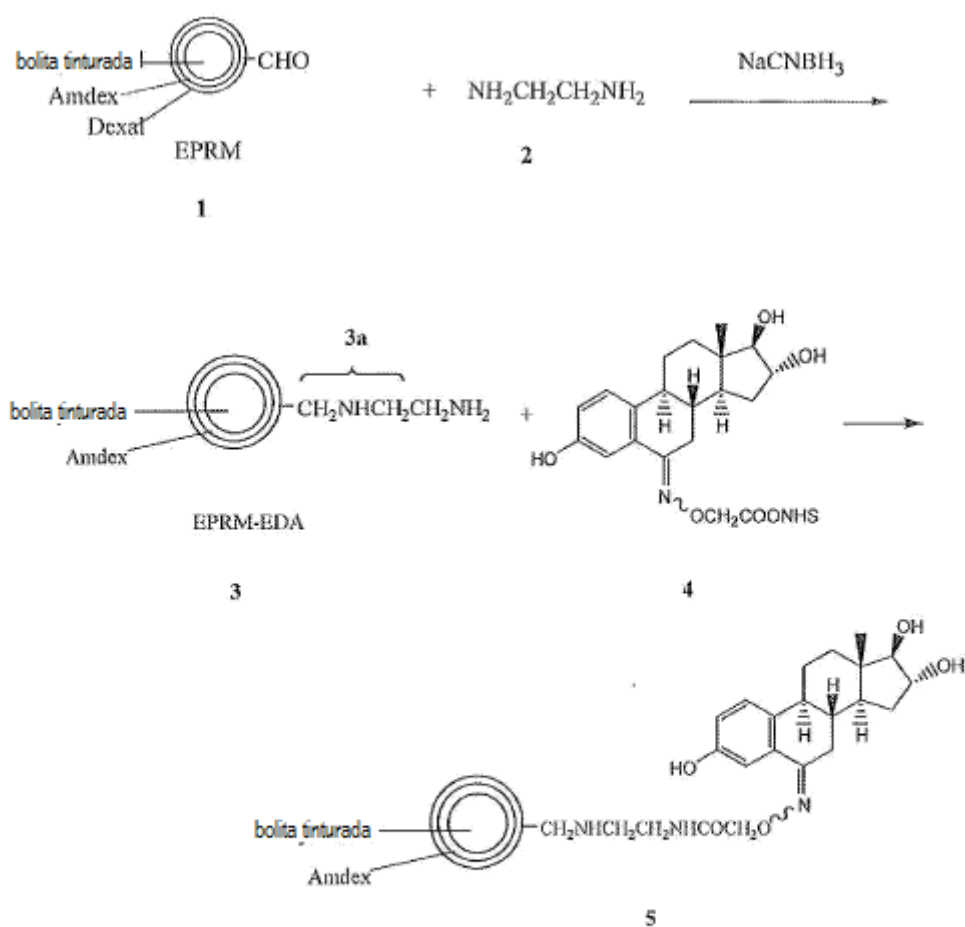


Fig. 1