

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 487**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2009 PCT/US2009/030294**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2009 WO09089262**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2009 E 09700484 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2232257**

54 Título: **Estabilización de reactivos de ensayo en soporte sólido**

30 Prioridad:

08.01.2008 US 970658

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

13.05.2019

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.

(100.0%)

**511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**ZHENG, YI FENG y
WEI, TIE Q.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 712 487 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

Estabilización de reactivos de ensayo en soporte sólido

Antecedentes

5 La invención se refiere a reactivos de soporte sólido que se emplean en métodos y kits para la determinación de analitos en muestras, tales como muestras de pacientes, que se sabe o se sospecha que contienen uno o más de los analitos.

10 En los campos de la medicina y la química clínica, muchos estudios y determinaciones de especies o analitos fisiológicamente reactivos se llevan a cabo utilizando conjugados que implican miembros de pares de unión específicos y soportes y/o etiquetas o similares. Se conocen diversas técnicas de ensayo que implican la unión de miembros de pares de unión específicos. Los propios analitos son normalmente miembros de pares de unión específicos, lo que permite su detección empleando un miembro correspondiente del par de unión específico al que pertenece el analito en cuestión.

15 Se puede diagnosticar y controlar una variedad de afecciones clínicas detectando la presencia y/o la cantidad de un analito de miembro de par de unión específico en una muestra. Los resultados de los ensayos químicos, bioquímicos y biológicos se utilizan para tomar decisiones importantes; y, por lo tanto, la precisión y fiabilidad del resultado es de suma importancia. Hasta ahora, las muestras de control de concentración conocida se analizan periódicamente, o incluso simultáneamente con la muestra que se va a medir, para calibrar y verificar el funcionamiento del ensayo en la muestra desconocida. Este proceso reduce, pero no elimina, la posibilidad de error en el ensayo de interés.

20 A medida que ha aumentado la importancia de medir la presencia de un analito en una muestra, se han desarrollado varios medios para detectar tales analitos. Un método implica la conjugación de un marcador a un miembro de par de unión específico que se emplea como reactivo de ensayo para unirse al analito. En otras metodologías, un miembro de par de unión específico para la detección del analito se conjuga con un soporte, que se emplea como un reactivo de ensayo de diversas maneras junto con otros reactivos para detectar el analito en cuestión.

También se utilizan combinaciones de las metodologías anteriores.

25 Ensayos en los que una muestra y uno o más reactivos reaccionan de diversas maneras para formar un complejo como un anticuerpo/antígeno o un complejo similar, que luego se pueden observar para medir la presencia o el nivel de un analito o uno o más de varios analitos en la muestra, son bien conocidos. Típicamente, en algunas realizaciones se usa un anticuerpo para analizar la presencia y/o la cantidad de un hapteno o un antígeno para el cual el anticuerpo es específico. Los haptenos y los antígenos incluyen, por ejemplo, péptidos, proteínas, hormonas, alcaloides, esteroides, anticuerpos, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, enzimas, receptores de superficie celular y similares.

35 La utilidad del reactivo de ensayo, sin embargo, dependerá de la especificidad del miembro del par de unión específica para el otro miembro, y también dependerá del nivel de unión no específica del reactivo de ensayo o de los componentes del reactivo. La unión no específica a menudo reduce la sensibilidad del ensayo. El grado de unión no específica limita la utilidad de un reactivo de ensayo. Cuanto mayor sea la unión no específica en un reactivo de ensayo particular, menor será la sensibilidad de la determinación.

40 En un enfoque para reactivos que implican soportes sólidos, un miembro de par de unión específico tal como, por ejemplo, un análogo de analito, está unido directamente al soporte sólido por unión covalente. Desafortunadamente, con tales reactivos, está presente una cantidad no insignificante de unión no específica del miembro de par de unión específica a la superficie del soporte sólido. Durante el almacenamiento y/o uso de dicho reactivo, el conjugado unido no específicamente se lixivia del soporte sólido y está presente en un medio de ensayo líquido. La presencia de dicho miembro del par de unión específica no unida específicamente conduce a imprecisiones en los métodos de ensayo empleados usando el reactivo. La unión no específica se refiere a la unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de las estructuras de superficie específicas. La unión no específica puede resultar de

45 varios factores que incluyen, por ejemplo, interacciones hidrófobas entre moléculas, adsorción física a la superficie porosa del soporte sólido, y similares.

El documento US 2004072262 A1 describe placas recubiertas con avidina cargadas con monómeros MHC biotinilados en un complejo con un péptido.

50 Persiste una necesidad de reactivos de ensayo, que exhiban una unión no específica reducida cuando se usan en ensayos para la detección de uno o más analitos. En particular, persiste la necesidad de un reactivo de ensayo que comprenda un soporte sólido en donde un analito análogo que pueda unirse no específicamente al soporte sólido no interfiera en un ensayo realizado con dicho reactivo.

Resumen

5 Una realización de la presente invención es un reactivo de ensayo seco, que comprende un soporte sólido en partículas y una o más moléculas de un receptor inmovilizado en el soporte sólido. El receptor comprende de 2 a 7 sitios de unión para un ligando. Una porción de un número total de los sitios de unión se une a un conjugado que comprende el ligando unido a un miembro de par de unión específico y una porción del número total de los sitios de unión está libre para capturar el conjugado miembro-ligando sbp no específicamente unido a el soporte sólido y/o disociarse del soporte sólido. La relación molar del número total de sitios de unión del receptor al número de moléculas del ligando es de 1.5 a 4. El miembro del par de unión específica es un asociado de unión para un analito o un análogo de analito.

10 En una realización preferida de la presente invención se trata un reactivo de ensayo seco, que comprende un soporte sólido en partículas y una o más moléculas de un asociado de unión a biotina inmovilizado sobre el soporte sólido en partículas. Una porción de un número total de sitios de unión de un asociado de unión a biotina se une a un conjugado que comprende biotina unida a un miembro de par de unión específico y una porción del número total de los sitios de unión de el asociado de unión de biotina está libre.

15 Otra realización de la presente invención es un método para determinar la presencia y/o cantidad de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito. Se proporciona una combinación en un medio acuoso, la muestra y los reactivos para detectar el analito, en donde al menos uno de los reactivos comprende el reactivo de ensayo seco mencionado anteriormente. La combinación se incuba bajo condiciones para la unión del analito a uno o más de los reactivos. La presencia y/o la cantidad de unión del analito a uno o más de los reactivos se detecta cuando la presencia y/o cantidad de la unión está relacionada con la presencia y/o cantidad del analito en la muestra.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 es una representación de las estructuras de la ciclosporina A y la ciclosporina C.

La Figura 2 es una representación del Esquema 1, preparación de los Compuestos (2) y (3).

La Figura 3 es una representación del Esquema 2, preparación de Compuestos de Rapa-C26/C32-PEO₄-Biotina (4) y (5).

25 La Figura 4 es una representación del Esquema 3, la preparación de Rapa-C26-PEO₄-Biotina (4) y la preparación de Rapa-C32-PEO₄-Biotina (5).

La figura 5 es una representación de la preparación de dióxido de cromo Siro-Dexal preformado (10).

La Figura 6 es una representación del Esquema 5, preparación de Tacrolimus-PEO₄-Biotina (12).

La Figura 7A es una representación de la estructura de un conjugado de anticuerpo para la ciclosporina A y la biotina.

La Figura 7B es una representación de la estructura de otro conjugado de anticuerpo para la ciclosporina A y la biotina.

30 La Figura 8 es una representación de la estructura de un conjugado de un anticuerpo para la ciclosporina A y partículas quimioluminiscentes.

La Figura 9 es una representación de la estructura de un conjugado de ciclosporina A y bis-biotina.

La Figura 10 es una representación de la preparación de un conjugado de un anticuerpo para la ciclosporina A y una partícula quimioluminiscente.

35 La Figura 11 es una representación de la preparación de bis-biotina que tiene un grupo de enlace.

La Figura 12 es una representación de la preparación de un intermedio de ciclosporina A.

La Figura 13 es una representación de la preparación de un conjugado de ciclosporina A y bis-biotina.

40 La Figura 14 es una representación gráfica de los resultados de otro ensayo para CsA de las presentes realizaciones que usan los siguientes reactivos: anticuerpo para partículas quimioluminiscentes de CsA y un reactivo preformado que comprende partículas sensibilizadoras de CsA-bis-biotina y estreptavidina.

Descripción detallada de realizaciones específicas

Discusión General

45 Los reactivos y métodos de la presente invención se refieren a métodos analíticos simples y específicos para detectar la presencia en una muestra de uno o más analitos. Los métodos actuales comprenden reactivos y formatos de ensayo que logran no solo la generación de señal suficiente, sino también una buena sensibilidad.

Realizaciones de reactivos de ensayo en seco

Las realizaciones de los presentes reactivos son reactivos secos que están en una forma que se disuelve fácilmente en un medio de ensayo acuoso. Los reactivos son estables durante la formación, en estado seco y cuando se formulan en un medio de ensayo. Los reactivos secos comprenden un miembro de par de unión específico (sbp) que está asociado con un soporte sólido en partículas. En lugar de unirse covalentemente al soporte sólido, el miembro sbp está unido covalentemente a un ligando para formar un conjugado miembro-ligando sbp y el soporte comprende un receptor para un ligando al que está unido el conjugado. El miembro sbp está asociado con el soporte por la unión entre el ligando y el receptor para el ligando. Se proporciona un exceso de sitios de unión del receptor sobre el soporte, de manera que una porción de los sitios de unión del receptor está libre. Los sitios de unión libres capturan el conjugado miembro-ligando sbp que podría unirse no específicamente al soporte sólido y/o que podría disociarse de un complejo del conjugado y el receptor en el soporte durante la formación del reactivo, durante un proceso para secar el reactivo o después de que el reactivo seco se disuelva en un medio de ensayo acuoso durante un ensayo. Como resultado, poco o nada de conjugado de ligando miembro sbp disociado o no unido está disponible para unirse a el asociado de unión del miembro sbp, que se emplea como uno de los reactivos en la determinación del ensayo. Por lo tanto, la sensibilidad del ensayo se ve aumentada por la reducción de los componentes no específicamente unidos y/o disociados del reactivo que de otro modo podrían distorsionar la medición de la cantidad de analito que se va a determinar. La reducción de la unión y disociación no específicas se logra mediante un reequilibrio del conjugado miembro-ligando sbp de la unión a los sitios de unión no específica en el soporte sólido a la unión a los sitios de unión específica vacantes de los receptores en el soporte sólido. Tal como se usa en el presente documento, el término "asociado" debe entenderse ampliamente y comprende, por ejemplo, un enlace covalente o un enlace no covalente, un enlace directo y un enlace indirecto, la absorción a una superficie y un recinto en una cavidad, etc.

Además, la presente invención evita un problema observado por los presentes inventores en un proceso tal como, por ejemplo, la liofilización, para preparar reactivos secos que implican complejos inmovilizados de receptor-ligando, particularmente con respecto a moléculas hidrófobas. Los presentes inventores observaron que podría ocurrir una cierta cantidad de disociación de tales complejos durante el proceso de secado. Como se mencionó anteriormente, en los presentes reactivos, un miembro sbp está unido covalentemente a un ligando para formar un conjugado miembro-ligando sbp y el soporte comprende un receptor para un ligando al que está unido el conjugado. El miembro sbp está asociado con el soporte por la unión entre el ligando y el receptor para el ligando. Se proporciona un exceso de sitios de unión del receptor sobre el soporte de modo que una parte de los sitios de unión del receptor esté libre para capturar componentes no específicamente unidos y/o disociados del reactivo.

Como se mencionó anteriormente, una realización de la presente invención es un reactivo de ensayo seco, que comprende un soporte sólido y una o más moléculas de un receptor inmovilizado sobre el soporte sólido. El receptor comprende uno o más sitios de unión para un ligando. Una porción de un número total de los sitios de unión está unida a un conjugado que comprende el ligando unido, generalmente de manera covalente, a un miembro de par de unión específico y una porción del número total de los sitios de unión está libre. Un conjugado es una molécula compuesta por dos o más subestructuras unidas entre sí, ya sea directa o indirectamente a través de un grupo de enlace, para formar una estructura única.

El soporte puede comprender un material insoluble en agua, orgánico o inorgánico, sólido o fluido, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como partículas que incluyen perlas y partículas, película, membrana, tubo, pozo, tira, varilla, superficies planas como, por ejemplo, placa, tipo papel, etc., fibras y similares. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede o no ser suspendible en el medio en donde se emplea. Ejemplos de soportes suspendibles son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles, partículas magnéticas y similares. 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), nylon, poli(etil butirato), etc.; ya sea por sí mismos o en conjunto con otros materiales.

En algunas realizaciones, los soportes empleados son partículas. Las partículas deben tener un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0.02 micrones y no más de aproximadamente 100 micrones. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0.05 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros, o de aproximadamente 0.3 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un intervalo de área superficial de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 m²/g y en algunas realizaciones las partículas tienen un área superficial en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 m²/g. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferiblemente de una densidad de agua aproximada, generalmente de aproximadamente 0.7 g/mL a aproximadamente 1.5 g/mL, y compuesta de material que puede ser transparente, parcialmente transparente, u opaco. Las partículas pueden tener una forma regular o irregular. Pueden ser, por ejemplo, esferas, esferoides o esferas que poseen cavidades o poros de mayor o menor tamaño. Las partículas pueden comprender varias capas, como las denominadas partículas de núcleo y cubierta, que tienen un núcleo y una o más capas envolventes. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, Staphylococcus aureus, E. coli, virus y similares. Las partículas también pueden ser partículas compuestas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, partículas magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones, lipoproteínas, cristales de tinte, soles metálicos, partículas de sílice, partículas de vidrio, partículas magnéticas, gotas de aceite, partículas lipídicas, dextrano y agregados de proteínas y similares.

En algunas realizaciones, las partículas son micropartículas, que son partículas que tienen un diámetro aproximado de al menos 20 nm y no más de 20 micrones, o entre 40 nm y 10 micrones, o entre 0.1 y 10 micrones, o entre 0.1 y 5 micras, o entre 0.15 y 2 micras. En muchas realizaciones, las micropartículas son partículas que pueden suspenderse en soluciones acuosas.

5 Las partículas de polímero pueden estar formadas por polímeros de adición o condensación. Las partículas serán fácilmente dispersables en un medio acuoso y pueden ser adsorbentes o funcionalizables para permitir la conjugación a un miembro de un sbp, ya sea directa o indirectamente a través de un grupo de enlace. Las partículas también pueden derivarse de materiales naturales, materiales naturales que se modifican sintéticamente y materiales sintéticos. Entre los polímeros orgánicos de particular interés están los polisacáridos, particularmente los polisacáridos reticulados, como la agarosa, que está disponible como sefarsa, dextrano, disponible como Sephadex y Sephacryl, celulosa, almidón y similares; polímeros de adición, tales como poliestireno, alcohol polivinílico, homopolímeros y copolímeros de derivados de acrilato y metacrilato, particularmente ésteres y amidas que tienen funcionalidades hidroxilo libres, y similares.

10 En algunas realizaciones, las partículas son partículas magnéticas. Cuando las partículas son magnéticas, el material magnético contenido en las partículas puede ser cualquier material magnético susceptible de atracción por un imán permanente o un electroimán. Ejemplos de tales materiales magnéticos incluyen óxidos de hierro magnéticos, dióxidos de cromo magnéticos (CrO₂), MnFeO₄, ZnFeO₄, CoFe₂O₄ y materiales magnéticos similares.

15 Un ejemplo particular de realizaciones de partículas magnéticas incluye aquellas que tienen un núcleo magnético rodeado por un material polimérico. El material polimérico puede ser cualquier material polimérico adecuado para uso en ensayos tales como, por ejemplo, inmunoensayos; se prefieren el poliestireno y el poliestireno-divinilbenceno por su fácil disponibilidad. Además, el material polimérico preferiblemente tiene grupos funcionales reactivos con grupos aldehído o puede modificarse por métodos conocidos en la técnica para contener dichos grupos reactivos aldehído. Ejemplos de tales grupos funcionales incluyen amina, hidrazina, hidrazida, aminooxi, cianuro, grupos alcohol y similares.

20 Otro ejemplo de partículas magnéticas que pueden usarse para poner en práctica la invención son las partículas magnéticas de dióxido de cromo (partículas de cromo) que tienen grupos de superficie colgantes que son reactivos al aldehído o que pueden modificarse para contener tales grupos reactivos aldehído. Dichas partículas de óxido de cromo magnético incluyen aquellas que comprenden un núcleo de CrO₂ que tiene una superficie reducida, que luego se recubre con sílice y se recubre además con un silano como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,661,408. La capa exterior de silano es capaz de unir proteínas, incluyendo anticuerpos y especies de antígenos, ligandos, haptenos o compuestos de enlace directamente o a través de agentes de acoplamiento intermedios al núcleo recubierto. Agentes de enlace y/o acoplamiento útiles en componentes de enlace incluyen ácidos dicarboxílicos y anhídridos, poliaminas, polialdehídos y agentes heterobifuncionales tales como clorhidrato de 2-iminotiolano, sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, m-maleimidossuccinimida éster, N-succinimidil-(4-yodoacetil)aminobenzoato, y especies similares conocidas por los expertos en la técnica. Otras realizaciones particulares de partículas magnéticas y no magnéticas que pueden emplearse en los presentes reactivos son las descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 6,231,982.

25 Se inmovilizan una o más moléculas de un receptor sobre el soporte sólido. El receptor comprende uno o más sitios de unión para un ligando. Los términos ligando y receptor se usan en este documento para diseñar moléculas que están implicadas en la unión de un conjugado de miembro ligando-sbp a un receptor que está asociado con un soporte sólido. Los ligandos y receptores son miembros sbp, pero se distinguen en el presente documento con el propósito de describir los métodos y reactivos presentes. El término miembro sbp se usa en este documento para denotar un reactivo que está involucrado en la detección de un analito en lugar de en la unión de una unidad estructural al soporte sólido, para el cual se usan los términos ligando y receptor. Un receptor es cualquier molécula capaz de reconocer una organización espacial y polar particular de otra molécula, por ejemplo, un sitio epitópico o determinante. En general, las moléculas tienen áreas en sus superficies o en cavidades que dan lugar a un reconocimiento específico entre las dos moléculas. El sitio de reconocimiento en el receptor que se une específicamente a un sitio en el ligando se denomina aquí como un sitio de unión. El término unión específica como se usa en este documento es el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes para la otra en comparación con el reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Un ligando es cualquier compuesto orgánico para el cual un receptor existe naturalmente o se puede preparar. Ejemplos de receptores que pueden emplearse en los presentes reactivos incluyen asociados de unión a biotina, por ejemplo, estreptavidina y avidina, anticuerpos, ácidos nucleicos antisentido monocatenarios, aptámeros, receptores de hormonas, enzimas, etc.

30 Una única molécula de receptor puede tener uno o más sitios de unión para un ligando. El número de sitios de unión del receptor para el ligando puede ser 1, o 2, o 3, o 4, o 5, o 7, y así sucesivamente en los que el rango es de 1 a aproximadamente 8, o de 1 a aproximadamente 7, o 1 a aproximadamente 6, o 1 a aproximadamente 5, o 1 a aproximadamente 4, o 1 a aproximadamente 3, o 1 a 2, o 2 a aproximadamente 7, o 2 a aproximadamente 6, o 2 a aproximadamente 5, o 2 a aproximadamente 4, o 2 a aproximadamente 3, o 3 a aproximadamente 7, o 3 a aproximadamente 6, o 3 a aproximadamente 5, o 3 a aproximadamente 4, y así sucesivamente.

En muchas realizaciones, el ligando del conjugado de miembro ligando-sbp es una molécula pequeña o un residuo de una molécula pequeña. Las moléculas pequeñas tienen un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 2000, o aproximadamente 150 a aproximadamente 1000, y existe o puede prepararse un receptor para la molécula pequeña. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen biotina y derivados de biotina como, por ejemplo, bis-biotina, etc., ácido lisérgico, fluoresceína y derivados de fluoresceína, dinitrofenol, digoxigenina, ácidos nucleicos monocatenarios, vitamina B₁₂, inhibidores de enzimas suicidas y similares. Los receptores correspondientes para las pequeñas moléculas mencionadas anteriormente son, respectivamente, un asociado de unión a biotina, por ejemplo, avidina o estreptavidina, anti-ácido lisérgico, anti-fluoresceína, anti-dinitrofenol, anti-digoxigenina, ácidos nucleicos monocatenarios antisentido, factores intrínsecos, y enzimas.

Como se mencionó anteriormente, además de las interacciones ligando-receptor, los presentes reactivos y métodos también involucran miembros sbp a diferencia de las moléculas de ligando y receptor discutidas anteriormente. Un miembro de un par de unión específico (miembro "sbp") es una de dos moléculas diferentes que tienen un área en la superficie o en una cavidad que se une específicamente y, por lo tanto, se define como complementaria con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros sbp complementarios se unen entre sí. Con respecto a dos miembros sbp complementarios, uno puede ser referido como el "asociado vinculante" para el otro. Ejemplos de miembros sbp incluyen interacciones anticuerpo-antígeno, interacciones enzima-sustrato, interacciones polinucleotídicas, etc. Los miembros sbp ilustrativos incluyen receptores de origen natural, por ejemplo, globulina de unión a tiroxina, anticuerpos, enzimas, fragmentos Fab, lectinas, ácidos nucleicos, proteína A, componente del complemento C1q y similares. Al menos uno de los miembros sbp de los presentes reactivos y métodos es uno que se une específicamente a un analito como, por ejemplo, un anticuerpo para el analito, o uno que se une a un miembro sbp específico para el analito, como un análogo de analito. y, por lo tanto, puede competir con el analito para unirse al miembro sbp específico para el analito, que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo para el analito.

Las moléculas pequeñas, en particular, y los ligandos, en general, pueden unirse a un miembro sbp para formar un conjugado de miembro ligando-sbp que tiene al menos una, o 2 a aproximadamente 20, moléculas pequeñas por miembro sbp dependiendo de la naturaleza del miembro sbp. Los miembros de sbp más grandes, tales como, por ejemplo, anticuerpos, tienen 1 a aproximadamente 20 moléculas pequeñas unidas a ellos. La unión de la molécula pequeña al miembro sbp se puede lograr mediante la unión covalente, que generalmente involucra reacciones químicas que resultan en la sustitución de un átomo de hidrógeno de la molécula pequeña con un enlace al miembro sbp, o por un grupo de enlace entre la molécula pequeña y el miembro sbp de cualquier tamaño, pero preferiblemente no mayor que el necesario para permitir la unión al conjugado de un receptor para la molécula pequeña y el miembro sbp.

En algunas realizaciones, el grupo de enlace puede comprender aproximadamente 2 a aproximadamente 50 átomos, o 4 a aproximadamente 30 átomos, sin contar el hidrógeno y puede comprender una cadena de 2 a aproximadamente 30 átomos, o 3 a aproximadamente 20 átomos, cada uno seleccionado independientemente del grupo que normalmente consta de carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo. Parte o la totalidad del grupo de enlace puede ser una porción de la molécula que está unida a otra molécula tal como, por ejemplo, un residuo de aminoácido en un poli(aminoácido) y similares.

El número de heteroátomos en los grupos de enlace normalmente oscilará entre aproximadamente 0 y aproximadamente 20, o 1 a aproximadamente 15, o aproximadamente 2 a aproximadamente 10. Los grupos de enlace pueden ser alifáticos o aromáticos. Cuando hay heteroátomos, el oxígeno normalmente está presente como oxo u oxi, unido a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo, el nitrógeno normalmente está presente como nitro, nitroso o amino, normalmente unido a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el azufre es análogo al oxígeno; mientras que el fósforo está unido a carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, generalmente como fosfonato y fosfato mono o diéster. Las funcionalidades comunes para formar un enlace covalente entre el grupo de enlace y la molécula por conjugar son alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter y carboxilato, sulfonato y ésteres de fosfato, amidas y tioésteres. Una realización específica de un grupo de enlace que comprende heteroátomos es una funcionalidad oxima como se mencionó anteriormente.

En su mayor parte, cuando un grupo de enlace tiene una funcionalidad de enlace (funcionalidad para reaccionar con una unidad estructural) tal como, por ejemplo, un grupo no oxocarbonilo que incluye análogos de nitrógeno y azufre, un grupo fosfato, un grupo amino, agente de alquilación como halo o tosialquilo, oxi (hidroxilo o análogo de azufre, mercapto) oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona), u olefina activa como una vinil sulfona o un éster α -, β -insaturado, estas funcionalidades están vinculadas a grupos amina, grupos carboxilo, olefinas activas, agentes alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. Cuando se unen una amina y un ácido carboxílico o su derivado de nitrógeno o ácido fosfórico, se forman amidas, amidinas y fosforamidas. Cuando el mercaptano y la olefina activada están vinculados, se forman tioéteres. Cuando se unen un mercaptano y un agente alquilante, se forman tioéteres. Cuando el aldehído y una amina se unen en condiciones reductoras, se forma una alquilamina. Cuando se unen una cetona o un aldehído y una hidroxilamina (incluidos los derivados de la misma donde un sustituyente está en lugar del hidrógeno del grupo hidroxilo), se forma una funcionalidad oxima (=N-O-). Cuando se unen un ácido carboxílico o un ácido fosfato y un alcohol, se forman ésteres. En la técnica son bien conocidos diversos grupos de enlace; véase, por ejemplo, Cautrecasas, J. Biol. Chem. (1970) 245: 3059.

Como se mencionó anteriormente, una porción de un número total de los sitios de unión del receptor está unido a un conjugado que comprende el ligando unido covalentemente, ya sea directamente o a través de un grupo de enlace, a un miembro sbp y una porción del número total de los sitios la unión del receptor está libre. El número de sitios de unión libres, es decir, el número de sitios de unión del receptor que están libres para unirse al ligando es suficiente para capturar todas las moléculas de conjugado que pueden unirse no específicamente al soporte sólido y/o que pueden disociarse del soporte sólido. La relación molar del número total de sitios de unión del receptor al número de moléculas de ligando del conjugado de miembro ligando-sbp depende de la naturaleza del receptor, la naturaleza del ligando y similares. La relación molar del número total de sitios de unión del receptor al número de moléculas de ligando es de 1,5 a 4. Como se mencionó anteriormente, un receptor particular comprende de 2 a 7 sitios de unión para el ligando por molécula de receptor.

El número total de sitios de unión mencionado anteriormente es el número total de sitios de unión para todas las moléculas del receptor que están presentes en la superficie sólida. Por ejemplo, la estreptavidina tiene cuatro sitios de unión para la biotina. Por lo tanto, el número total de sitios de unión para estreptavidina en un soporte sólido es el número total de moléculas de estreptavidina en el soporte sólido por el número de sitios de unión para cada molécula de estreptavidina, es decir, cuatro. En este ejemplo particular en donde está implicada la unión de estreptavidina-biotina, una realización deseable del presente reactivo tiene una molécula de estreptavidina por dos moléculas de biotina, de modo que la relación molar del número total de sitios de unión a las moléculas de biotina es 4:2 o 2:1. Se ha descubierto que dicha relación estabiliza la estructura tetramérica de estreptavidina al tiempo que permite la captura de conjugado no unido y/o disociado de forma no específica por los sitios de unión restantes del tetrámero de estreptavidina.

Las reacciones involucradas en la preparación del reactivo de ensayo discutido anteriormente generalmente se llevan a cabo en un medio líquido. Después de la preparación del reactivo de ensayo en un medio líquido, el producto resultante se seca mediante técnicas convencionales, que incluyen, por ejemplo, liofilización, aplicación de calor, aplicación de vacío, desecación, absorción de humedad, vaporización del solvente y similares, o una combinación de las técnicas anteriores. Dependiendo de la naturaleza del soporte sólido de los presentes reactivos, el reactivo seco se puede preparar en forma de comprimido, polvo y similares. Para un soporte tal como papel, placa de microtitulación, virutas y similares, la superficie del soporte puede comprender, en una forma seca, moléculas de receptor con sitios de unión que están libres y sitios de unión que se unen al conjugado de miembro ligando-sbp. El reactivo seco se almacena a aproximadamente 0°C a aproximadamente 35°C, o aproximadamente 2°C a aproximadamente 30°C, o aproximadamente 5°C a aproximadamente 25°C, o a temperatura ambiente o del entorno, o en algunas realizaciones por debajo de 0°C, hasta que se utiliza en un método de ensayo para la determinación de un analito. El reactivo de ensayo se prepara y se seca de una manera que hace que el reactivo seco resultante pueda reconstituirse fácilmente en un medio de ensayo, que generalmente es un medio acuoso. El reactivo de ensayo seco puede contener una o más sustancias o excipientes que promueven la reconstitución del reactivo seco en un medio de ensayo. Tales sustancias incluyen, por ejemplo, trehalosa, polietilenglicol 8000 y similares.

Métodos que emplean los presentes reactivos de ensayo en seco.

Como se mencionó anteriormente, los presentes reactivos de ensayo en seco pueden emplearse en métodos para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito. Los métodos de ensayo empleados miden la cantidad de analito en la muestra y pueden ser cuantitativos, semicuantitativos o cualitativos. Por ejemplo, un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito, se considera que está incluido dentro del alcance de la presente invención. Los términos "detección" y "determinación", así como otros sinónimos comunes para medición, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

La muestra y los reactivos para detectar el analito se combinan en un medio acuoso. Al menos uno de los reactivos comprende el reactivo de ensayo seco descrito anteriormente. Otros reactivos empleados dependen de la naturaleza del analito, la naturaleza del método de ensayo particular, la naturaleza de la molécula de señalización, la naturaleza del sistema de detección y similares, cuyos ejemplos se analizan a continuación. La combinación se incuba bajo condiciones para la unión del analito a uno o más de los reactivos. La presencia y/o la cantidad de unión del analito a uno o más de los reactivos se detecta cuando la presencia y/o cantidad de la unión está relacionada con la presencia y/o cantidad del analito en la muestra.

El analito es un compuesto o composición que se va a detectar. El analito puede comprender un miembro de un par de unión específico (sbp) donde el miembro complementario del par de unión específico se usa en la detección del analito. Los analitos de ligando monoepitópicos generalmente tendrán un peso molecular de aproximadamente 100 a 2000, más generalmente de peso molecular 125 a 1000. Los analitos incluyen medicamentos, metabolitos, pesticidas, contaminantes y similares. Analitos representativos, a modo de ejemplo y no limitativos, incluyen (i) alcaloides tales como alcaloides de morfina, que incluyen morfina, codeína, heroína, dextrometorfano, sus derivados y metabolitos; alcaloides de cocaína, que incluyen cocaína y bencilecgonina, sus derivados y metabolitos; alcaloides del ergot, que incluyen la dietilamida del ácido lisérgico; alcaloides esteroides; alcaloides de iminazoilo; alcaloides de quinazolina; alcaloides de isoquinolina; alcaloides de quinolina, que incluyen quinina y quinidina; alcaloides diterpénicos, sus derivados y metabolitos; (ii) esteroides, que incluyen los estrógenos, andrógenos, esteroides androcorticales, ácidos biliares, glucósidos cardiotónicos y agliconas, que incluyen digoxina y digoxigenina, saponinas y sapogeninas, sus

derivados y metabolitos; sustancias miméticas esteroideas, tales como dietilestilbestrol; (iii) lactamas que tienen de 5 a 6 miembros anulares, que incluyen barbitúricos, por ejemplo, fenobarbital y secobarbital, difenilhidantoína, primidona, etosuximida y sus metabolitos; (iv) aminoalquilbencenos, con alquilo de 2 a 3 átomos de carbono, que incluyen las anfetaminas; catecolaminas, que incluyen efedrina, L-dopa, epinefrina; narceína papaverina; y metabolitos de los anteriores; (v) benzheterocíclicos que incluyen oxazepam, clorpromazina, tegretol, sus derivados y metabolitos, los anillos heterocíclicos que son azepinas, diazepinas y fenotiazinas; (vi) purinas, que incluyen teofilina, cafeína, sus metabolitos y derivados; (vii) drogas derivadas de la marihuana, que incluyen cannabino y tetrahidrocannabinol; (viii) hormonas como tiroxina (T4), triyodotironina (T3), cortisol, triyodotironina, testosterona, estradiol, estrona, progesterona, polipéptidos como la angiotensina, LHRH e inmunosupresores como la ciclosporina (A, B, C, D, E, F, G, etc.), FK506, ácido micofenólico (MPA), etc. (ix) vitaminas tales como A, B, por ejemplo, B12, C, D, E y K, ácido fólico, tiamina; (x) prostaglandinas, que difieren según el grado y los sitios de hidroxilación e insaturación; (xi) antidepresivos tricíclicos, que incluyen imipramina, desmetilimipramina, amitriptilina, nortriptilina, protriptilina, trimipramina, clomipramina, doxepina y desmetilodoxepina; (xii) antineoplásticos, que incluyen metotrexato; (xiii) antibióticos, que incluyen penicilina, cloramomicetina, actinomicetina, tetraciclina, terramicina, los metabolitos y derivados; (xiv) nucleósidos y nucleótidos, que incluyen ATP, NAD, FMN, adenosina, guanosina, timidina y citidina con sus sustituyentes de azúcar y fosfato apropiados; (xv) medicamentos individuales variados que incluyen metadona, meprobamato, serotonina, meperidina, lidocaína, procainamida, acetilprocainamida, propranolol, griseofulvina, ácido valproico, butirofenonas, antihistamínicos, cloranfenicol, fármacos anticolinérgicos, como la atropina, sus metabolitos y derivados. (xvi) los metabolitos relacionados con estados de enfermedad incluyen espermina, galactosa, ácido fenilpirúvico y porfirina Tipo 1; (xvii) aminoglucósidos, tales como gentamicina, kanamicina, tobramicina y amikacina; y (xviii) pesticidas tales como bifenilos polihalogenados, ésteres de fosfato, tiofosfatos, carbamatos, sulfenamidas polihalogenadas, sus metabolitos y derivados.

Los analitos polivalentes son normalmente poli(aminoácidos), es decir, polipéptidos y proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos. Tales combinaciones incluyen componentes de bacterias, virus, cromosomas, genes, mitocondrias, núcleos, membranas celulares y similares. En su mayor parte, los analitos de los ligandos poliepitópicos tendrán un peso molecular de al menos aproximadamente 5000, más generalmente al menos aproximadamente 10 000. En la categoría de poli(aminoácidos), los poli(aminoácidos) de interés generalmente serán de aproximadamente 5000 a 5 000 000 de peso molecular, más generalmente de aproximadamente 20 000 a 1 000 000 de peso molecular; entre las hormonas de interés, los pesos moleculares generalmente oscilarán entre aproximadamente 5000 y 60 000 de peso molecular.

El analito incluye una amplia variedad de proteínas que pueden ser de una familia de proteínas que tienen características estructurales similares, proteínas que tienen funciones biológicas particulares, proteínas relacionadas con microorganismos específicos, particularmente microorganismos causantes de enfermedades, etc. Dichas proteínas incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas, citoquinas, enzimas, hormonas, antígenos del cáncer, marcadores nutricionales, antígenos específicos de tejidos, etc. Dichas proteínas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, protaminas, histonas, albúminas, globulinas, escleroproteínas, fosfoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, glicoproteínas, receptores de células T, proteoglicanos, HLA, proteínas no clasificadas, por ejemplo, somatotropina, prolactina, insulina, pepsina, proteínas que se encuentran en el plasma humano, factores de coagulación de la sangre, hormonas proteicas como, por ejemplo, hormona estimulante del folículo, hormona luteinizante, luteotropina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormonas tisulares, citoquinas, antígenos del cáncer como, por ejemplo, PSA, CEA, α -fetoproteína, fosfatasa ácida, CA19.9 y CA125, antígenos específicos de tejidos, como, por ejemplo, fosfatasa alcalina, mioglobina, CPK-MB y calcitonina, y hormonas peptídicas. Otros materiales poliméricos de interés son los mucopolisacáridos y los polisacáridos. El término analito incluye además analitos de oligonucleótidos y polinucleótidos tales como m-ARN, r-ARN, t-ARN, ADN, ADN-ARN dúplex, etc.

La muestra por analizar es una de la que se sospecha que contiene el analito. El analito puede ser una molécula que se encuentra directamente en una muestra como un tejido biológico, incluidos los fluidos corporales, de un huésped. Las muestras son preferiblemente de humanos o animales e incluyen fluidos biológicos como sangre entera, suero, plasma, esputo, fluido linfático, semen, moco vaginal, heces, orina, fluido espinal, saliva, excrementos, fluido cerebroespinal, lágrimas, moco y similares; tejido biológico, como cabello, piel, cortes o tejidos extirpados de órganos u otras partes del cuerpo; etc. En muchos casos, la muestra es sangre entera, plasma o suero y, en una realización particular, la muestra es sangre entera.

La muestra puede prepararse en cualquier medio conveniente. Convenientemente, la muestra puede prepararse en un medio de ensayo, que se explica más detalladamente a continuación. En algunos casos, se puede aplicar un tratamiento previo a la muestra como, por ejemplo, para someter a lisis células sanguíneas y similares. La muestra se puede examinar directamente o se puede tratar previamente para hacer que el analito sea más fácilmente detectable mediante la eliminación de materiales no deseados. La muestra puede pretratarse para separar o someter a lisis células; precipitar, hidrolizar o desnaturalizar proteínas; hidrolizar los lípidos; solubilizar el analito; o similares. Tales tratamientos previos pueden incluir, sin limitación: centrifugación; tratamiento de la muestra con un disolvente orgánico, por ejemplo, un alcohol, como el metanol; y tratamiento con detergentes. Dicho pretratamiento generalmente se realiza en un medio que no interfiere posteriormente con un ensayo.

La muestra se puede preparar en cualquier medio conveniente que no interfiera con un ensayo. Se prefiere un medio acuoso y típicamente es uno que puede ser únicamente agua o puede incluir de 0.1 a aproximadamente 40 por ciento

en volumen de un cosolvente tal como, por ejemplo, un disolvente orgánico, que puede ser un alcohol, éter, éster, amida y similares. Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en un ensayo. El medio puede comprender uno o más conservantes como se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, azida de sodio, sulfato de neomicina, PROCLIN® 300, estreptomina y similares. Además, los estabilizadores para el medio de ensayo y los componentes del ensayo pueden estar presentes en el medio de ensayo. Con frecuencia, además de estos aditivos, se pueden incluir proteínas, como las albúminas. Otros materiales auxiliares incluyen, por ejemplo, sales de amonio cuaternario, polianiones tales como sulfato de dextrano, tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos, potenciadores de la unión, por ejemplo, polialquilenglicoles y similares.

El pH para el medio estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, más habitualmente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9.5. Se pueden usar varios reguladores para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el período de incubación. Reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINE y similares. El medio también puede comprender agentes para prevenir la formación de coágulos de sangre. Tales agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, EDTA, EGTA, citrato, heparina y similares.

En los métodos de ensayo descritos en el presente documento, se emplea un sistema de producción de señales ("sps") para la detección de un analito. Los sps comprenden uno o más componentes, siendo al menos un componente una etiqueta detectable, que genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de etiqueta unida y/o no unida, es decir, la cantidad de etiqueta unida o no unida al compuesto que se está detectando, es decir, el analito. La etiqueta es cualquier molécula que produce o puede inducirse para producir una señal, y puede ser, por ejemplo, un fluorescente, radiomarcador, enzima, quimioluminiscente o fotosensibilizador. Por lo tanto, la señal se detecta y/o se mide detectando la actividad enzimática, la luminiscencia, la absorbancia de la luz o la radioactividad, según sea el caso.

Las etiquetas adecuadas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, enzimas tales como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH") y peroxidasa de rábano picante; ribozima; un sustrato para una replicasa tal como la replicasa QB; promotores; tintes; fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina; quimioluminiscentes tales como isoluminol; sensibilizadores; coenzimas; sustratos enzimáticos; radiomarcadores tales como ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^3H , ^{57}Co y ^{75}Se ; partículas tales como látex o partículas de carbono; sol de metal; cristalita; liposomas; células, etc., que pueden marcarse adicionalmente con un tinte, catalizador u otro grupo detectable. Las enzimas y coenzimas adecuadas se describen en Litman, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,275,149, columnas 19-28, y Boguslaski, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,318,980, columnas 10-14; fluorescentes y quimioluminiscentes adecuados se describen en Litman et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,275,149, en las columnas 30 y 31.

Hay numerosos métodos mediante los cuales la etiqueta puede producir una señal detectable por medios externos, deseablemente por examen visual, por ejemplo, por radiación electromagnética, calor y reactivos químicos. La etiqueta u otros miembros de sps también pueden asociarse con un miembro de sbp, otra molécula o un soporte. Las etiquetas incluyen grupos detectables por medio de radiación electromagnética o por detección electroquímica incluyendo colorantes, fluorescentes, quimioluminiscentes e isótopos radiactivos.

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

Alternativamente, la etiqueta puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema productor de señales incluiría todos los componentes requeridos para producir una señal medible, que puede incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos y una sustancia de unión específica requerida para la unión de sustancias que generan señales. Una discusión detallada de los sistemas adecuados para la producción de señales se puede encontrar en la Patente de los Estados Unidos No. 5,185,243, columnas 11-13.

La etiqueta y/u otro miembro sps pueden estar asociados con un miembro sbp, un soporte, otra molécula, etc. Por ejemplo, la etiqueta se puede unir covalentemente a un miembro sbp tal como, por ejemplo, un anticuerpo; un receptor para un anticuerpo, un receptor que es capaz de unirse a una molécula pequeña conjugada a un anticuerpo, o un análogo de ligando. La unión de la etiqueta al miembro sbp se puede lograr mediante reacciones químicas como se discutió anteriormente, lo que puede implicar una unión directa o unión a través de un grupo de enlace entre la etiqueta y el miembro sbp o similar. Otros miembros de sps también pueden estar vinculados covalentemente a miembros de sbp. Por ejemplo, dos miembros sps, como un fluorescente y un extintor, pueden unirse a un anticuerpo diferente que forma un complejo específico con el analito. La formación del complejo acerca el fluorescente y el extintor, lo que permite que el extintor interactúe con el fluorescente para producir una señal. Los métodos de conjugación son bien conocidos en la técnica e incluyen los descritos anteriormente. Además, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 3,817,837.

- 5 En algunas realizaciones, el sps tiene al menos el primer y segundo miembros sps. La designación "primero" y "segundo" es completamente arbitraria y no pretende sugerir ningún orden o clasificación entre los miembros sps ni ningún orden de adición de los miembros sps en los métodos actuales. En este sistema, los miembros sps están relacionados en cuanto la activación de un miembro sps produce un producto tal como, por ejemplo, la luz, que resulta en la activación de otro miembro sps. El segundo miembro sps generalmente genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de analito en la muestra.
- 10 En algunas realizaciones, el primer miembro sps es un sensibilizador, tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador y el segundo miembro sps es una composición quimioluminiscente que se activa como resultado de la activación del primer miembro sps. El sensibilizador puede ser cualquier unidad estructural que, al activarse, produce un producto que activa la composición quimioluminiscente, que a su vez genera una señal detectable. En muchas realizaciones, el sensibilizador es capaz de generar oxígeno singlete tras la activación. Ejemplos de fotosensibilizantes y composiciones quimioluminiscentes que pueden utilizarse son los que se exponen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,340,716 y 6,153,442.
- 15 Para los inmunoensayos, los métodos emplean al menos un anticuerpo para el analito. Por la frase "anticuerpo para el analito" se entiende un anticuerpo que se une específicamente al analito y/o análogo del analito y no se une en ningún grado significativo a otros componentes del ensayo o componentes de la muestra, de manera que el análisis para el analito sería distorsionado. Un análogo de analito es un analito modificado que puede competir con el analito por un receptor, proporcionando la modificación medios para unir un análogo de analito a otra molécula. El análogo del analito generalmente diferirá del analito en más que el reemplazo de un hidrógeno con un enlace que une el análogo del analito a un centro o etiqueta, pero no es necesario. El análogo del analito se une al receptor de una manera similar a la unión del analito al receptor. El análogo del analito puede ser, por ejemplo, el analito conjugado con otra molécula a través de un grupo de enlace, un anticuerpo dirigido contra el idiotipo de un anticuerpo al analito, y así sucesivamente.
- 20 Los anticuerpos específicos para un analito para uso en inmunoensayos pueden ser monoclonales o policlonales. Dichos anticuerpos pueden prepararse mediante técnicas que son bien conocidas en el arte, como la inmunización de un huésped y la recolección de sueros (policlonales) o preparando líneas celulares híbridas continuas y recolectando la proteína secretada (monoclonal) o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de los mismos que codifican al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales.
- 25 Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, cuyas inmunoglobulinas incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Sus fragmentos pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado, siempre que se mantenga la afinidad de unión a una molécula particular.
- 30 El antisuero que contiene anticuerpos (policlonales) se obtiene mediante técnicas bien establecidas que involucran la inmunización de un animal, como un conejo, cobaya o cabra, con un inmunógeno apropiado y obteniendo antisueros de la sangre del animal inmunizado después de un periodo de espera apropiado. Las revisiones del estado de la técnica son proporcionadas por Parker, radioinmunoanálisis de compuestos biológicamente activos, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., U.S., 1976), Butler, J. Immunol. Meth 7: 1-24 (1975); Broughton and Strong, Clin. Chem. 22: 726-732 (1976); y Playfair, et al., Br. Med. Bull. 30: 24-31 (1974).
- 35 Los anticuerpos también pueden obtenerse mediante técnicas de hibridación de células somáticas, denominándose dichos anticuerpos comúnmente como anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir según las técnicas estándar de Köhler and Milstein, Nature 265: 495-497, 1975. Las revisiones de las técnicas de anticuerpos monoclonales se encuentran en Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers, et al. Springer-Verlag (Nueva York 1978), Nature 266: 495 (1977), Science 208: 692 (1980) y Methods of Enzymology 73 (Part B): 3-46 (1981).
- 40 En otra metodología para la preparación de anticuerpos, la secuencia que codifica los sitios de unión del anticuerpo puede escindirse del ADN del cromosoma e insertarse en un vector de clonación, que puede expresarse en bacterias para producir proteínas recombinantes que tienen los sitios de unión del anticuerpo correspondientes.
- 45 Como se mencionó anteriormente, la muestra y los reactivos se proporcionan en combinación en el medio. Aunque el orden de adición al medio puede variar, habrá ciertas preferencias para algunas realizaciones de los formatos de ensayo descritos en este documento. El orden de adición más simple, por supuesto, 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 pueden combinarse secuencialmente. Cuando se combinan diversos agentes distintos a los concomitantes (simultáneamente), uno o más pueden combinarse con uno o más de los agentes restantes para formar una subcombinación. El reactivo de ensayo seco de las presentes realizaciones puede añadirse directamente al medio de ensayo o puede reconstituirse en un medio apropiado antes de la adición al medio de ensayo.
- 50 Se pueden aplicar uno o más periodos de incubación al medio de ensayo en uno o más intervalos que incluyen cualquier intervalo entre las adiciones de varios reactivos mencionados anteriormente. El medio generalmente se
- 55

incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos. Las temperaturas moderadas se emplean normalmente para llevar a cabo el método y, por lo general, a una temperatura constante, preferiblemente a temperatura ambiente, durante el período de medición. Las temperaturas de incubación varían de aproximadamente 5° a aproximadamente 99°C, o de aproximadamente 15°C a aproximadamente 70°C, o de 20°C a aproximadamente 45°C. El período de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0.2 segundos a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de unión de los diversos reactivos, que está determinada por la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de velocidad de disociación. Las temperaturas durante las mediciones generalmente oscilarán entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50°C, o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40°C.

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

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente se determinarán por el rango de concentración de interés del analito, la naturaleza del ensayo y similares. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo en el rango. Es decir, una variación en la concentración de analito que sea importante debería proporcionar una diferencia de señal medible con precisión. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema que produce la señal y la naturaleza de los analitos normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Después de cualquier período de incubación para la unión de los reactivos respectivos, se lleva a cabo un examen del medio o el soporte. En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio o del soporte sólido. La presencia y/o cantidad de la señal está relacionada con la presencia y/o cantidad del analito en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza de los sps. Como se discutió anteriormente, existen numerosos métodos por los cuales una etiqueta de un sps puede producir una señal detectable por medios externos, deseablemente por examen visual, e incluye, por ejemplo, radiación electromagnética, electroquímica, calor, detección de radioactividad, reactivos químicos, etc.

La activación de un sistema productor de señales depende de la naturaleza de los miembros del sistema que producen señales. Para un miembro sps que es un sensibilizador que se activa con la luz, el miembro sps se irradia con luz. A los expertos en la técnica se les sugerirán otros métodos de activación en vista de las divulgaciones de este documento.

El examen de la presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente una etapa en donde se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, fluorómetro, espectrómetro de absorción, luminómetro, quimioluminómetro, actinómetro, instrumento fotográfico y similares. La presencia y la cantidad de señal detectada están relacionadas con la presencia y la cantidad del analito presente en una muestra. Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían de aproximadamente 10° a aproximadamente 70°C, o de aproximadamente 20° a aproximadamente 45°C, o de aproximadamente 20° a aproximadamente 25°C. En una metodología, se conforman curvas estándar utilizando concentraciones conocidas de los analitos que se van a examinar. Como se mencionó anteriormente, también se pueden usar calibradores y otros controles.

Ejemplos de ensayos que emplean realizaciones del reactivo de ensayo seco

Como se mencionó anteriormente, los reactivos de ensayo seco discutidos anteriormente se pueden utilizar en ensayos de unión para analitos. Los reactivos de ensayo seco se aplican a todos los ensayos descritos a continuación, así como a otros ensayos que incluyen reactivos de soporte no mencionados específicamente en este documento. Los métodos de ensayo generalmente involucran una muestra sospechosa de contener un analito, que se combina en un medio de ensayo con reactivos para llevar a cabo el ensayo. Tales reactivos incluyen un soporte o reactivo en fase sólida. Otros reactivos de ensayo pueden incluir un asociado de unión para el analito si el miembro sbp en el soporte sólido no es un asociado de unión para el analito, análogos de analito, otros soportes sólidos a los que está unido uno de los reactivos, asociados de unión para miembros de sbp, y así sucesivamente. Uno o más de los reactivos pueden ser parte de un sistema productor de señales donde al menos uno de los reactivos puede estar marcado. Los reactivos se eligen de modo que se obtenga una señal de una etiqueta en relación con la presencia o la cantidad de analito en la muestra. El ensayo se puede realizar sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los compuestos o productos del ensayo. Dado que se utilizan soportes sólidos, el ensayo suele ser heterogéneo, aunque se conocen formatos homogéneos que utilizan dichos reactivos.

Los ensayos heterogéneos implican habitualmente uno o más pasos de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Una variedad de formatos de ensayos heterogéneos competitivos y no competitivos se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,089,390, columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9. En un ensayo heterogéneo

- competitivo típico, se contacta un soporte que tiene un anticuerpo para el analito unido al mismo con un medio que contiene la muestra y el análogo del analito conjugado a un marcador detectable, como una enzima (el "conjugado"). El analito en la muestra compite con el conjugado para unirse al anticuerpo. Después de separar el soporte y el medio, la actividad de la etiqueta del soporte o el medio se determina mediante técnicas convencionales y se relaciona con la cantidad de analito en la muestra. El reactivo de ensayo seco de acuerdo con las presentes realizaciones puede emplearse como el reactivo de soporte mencionado anteriormente. En este caso, el soporte tiene un receptor como, por ejemplo, estreptavidina, unido a él y un ligando-anticuerpo, por ejemplo, biotina-anticuerpo, conjugado se une al soporte mediante la unión de la estreptavidina en el soporte y la biotina del conjugado.
- Un ensayo en sándwich no competitivo típico es un ensayo descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 4,486,530, columna 8, línea 6 a columna 15, línea 63. En este método, se forma un complejo inmune en sándwich, en un medio de ensayo. El complejo comprende el analito, un primer anticuerpo (monoclonal o policlonal) que se une al analito y un segundo anticuerpo que se une al analito o un complejo del analito y el primer anticuerpo. Posteriormente, el complejo inmune en sándwich se detecta y se relaciona con la cantidad de analito en la muestra. El complejo inmune, en sándwich, se detecta en virtud de la presencia en el complejo de un marcador en donde uno o ambos, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo contienen marcadores o sustituyentes capaces de combinarse con marcadores. En este caso, el reactivo de ensayo seco de acuerdo con la presente divulgación comprende un soporte al cual se une un receptor, por ejemplo, estreptavidina, y un conjugado-ligando, por ejemplo, biotina-anticuerpo, conjugado se une al soporte por la unión de la estreptavidina sobre el soporte y la biotina del conjugado. El anticuerpo es uno de los primeros o segundos anticuerpos mencionados anteriormente.
- Los ensayos en sándwich encuentran uso en su mayor parte en la detección de antígenos y analitos de anticuerpos. En el ensayo, el analito está unido por dos anticuerpos específicos para el analito y, por lo tanto, el ensayo también se conoce como el ensayo inmunométrico de dos sitios. En una metodología, una primera incubación de un anticuerpo no marcado acoplado a un soporte, también conocido como el anticuerpo insolubilizado, se pone en contacto con un medio que contiene una muestra sospechosa de contener el analito. Después de una etapa de lavado y separación, el soporte se pone en contacto con un medio que contiene el segundo anticuerpo, que generalmente contiene una etiqueta, durante un segundo período de incubación. El soporte se lava nuevamente y se separa del medio y se examina el medio o el soporte para detectar la presencia de una etiqueta. La presencia y la cantidad de etiqueta están relacionadas con la presencia o la cantidad del analito. Para una discusión más detallada de esta metodología, consúltense las Patentes de los Estados Unidos Nos. Re. 29,169 y 4,474,878. En este caso, el reactivo de ensayo seco de acuerdo con la presente divulgación comprende un soporte al cual se une un receptor, por ejemplo, estreptavidina, y un conjugado-ligando, por ejemplo, biotina-anticuerpo, conjugado se une al soporte por la unión de la estreptavidina sobre el soporte y la biotina del conjugado. El anticuerpo es el anticuerpo no marcado mencionado anteriormente.
- En una variación del ensayo en sándwich anterior, la muestra en un medio adecuado se pone en contacto con el anticuerpo marcado para el analito y se incuba durante un período de tiempo. Luego, el medio se pone en contacto con un soporte al que se une un segundo anticuerpo para el analito. Después de un período de incubación, el soporte se separa del medio y se lava para eliminar los reactivos no unidos. El soporte o el medio se examina para detectar la presencia de la etiqueta, que está relacionada con la presencia o la cantidad de analito. Para una discusión más detallada de este enfoque, consúltense la Patente de los Estados Unidos No. 4,098.876. En este caso, el reactivo de ensayo seco de acuerdo con la presente divulgación comprende un soporte al cual se une un receptor, por ejemplo, estreptavidina, y un conjugado-ligando, por ejemplo, biotina-anticuerpo, conjugado se une al soporte por la unión de la estreptavidina sobre el soporte y la biotina del conjugado. El anticuerpo es el segundo anticuerpo para el analito mencionado anteriormente.
- En otra variación de lo anterior, la muestra, el primer anticuerpo unido a un soporte y el anticuerpo marcado se combinan en un medio y se incuban en una única etapa de incubación. La separación, los pasos de lavado y el examen de la etiqueta son los descritos anteriormente. Para una discusión más detallada de este enfoque, consúltense la Patente de los Estados Unidos No. 4,244,940. En este caso, el reactivo de ensayo seco de acuerdo con la presente divulgación comprende un soporte al cual se une un receptor, por ejemplo, estreptavidina, y un conjugado-ligando, por ejemplo, biotina-anticuerpo, conjugado se une al soporte por la unión de la estreptavidina sobre el soporte y la biotina del conjugado. El anticuerpo es el primer anticuerpo mencionado anteriormente.
- Otro ejemplo específico de una realización de un formato de ensayo en donde se puede emplear el presente reactivo de ensayo seco es ACMIA (inmunoensayo de afinidad mediado por dióxido de cromo) (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 7,186,518). Para el formato de ensayo ACMIA, el reactivo de ensayo seco de acuerdo con la divulgación en este documento comprende partículas de cromo a las que se une un receptor, por ejemplo, estreptavidina. Un ligando, por ejemplo, biotina, conjugado, que comprende biotina unida a un analito o análogo de analito se une a la estreptavidina. La relación molar del número de sitios de unión de las moléculas de estreptavidina a la biotina es mayor que 1. Los reactivos también incluyen un anticuerpo para el analito. Este anticuerpo está reticulado a una enzima informadora (por ejemplo, beta-galactosidasa) y se agrega a un recipiente de reacción en exceso. El conjugado anticuerpo-enzima se mezcla con una muestra para permitir que el analito se una al anticuerpo. A continuación, se agrega el reactivo de cromo seco mencionado anteriormente para unir cualquier exceso de conjugado anticuerpo-enzima. Luego, se aplica un imán, que extrae todo el cromo y el exceso de anticuerpo-enzima 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 la presencia de cantidad de rapamicina en la muestra.

- 5 En otro ejemplo específico de un formato de ensayo en sándwich, el reactivo de ensayo seco comprende partículas de cromo a las que se une un receptor, por ejemplo, estreptavidina. Un ligando, por ejemplo, biotina, conjugado que comprende biotina unida a un anticuerpo para el analito se une a la estreptavidina. La relación molar del número de sitios de unión de las moléculas de estreptavidina a la biotina es mayor que 1. Se emplea un segundo anticuerpo (o proteína de unión) específico para el analito conjugado con una enzima informadora. En este formato, el reactivo de ensayo seco se agrega a un medio de ensayo junto con la muestra. El medio se incuba para que todo el analito en la muestra se una a las partículas de cromo. Las partículas de cromo se lavan, utilizando un imán para separar el analito unido del sobrenadante. Luego, se agrega el segundo anticuerpo conjugado a la beta-galactosidasa y se incuba el medio de manera que se forme un sándwich que comprende el analito, la partícula de cromo y el segundo anticuerpo. Después del lavado, se mide la cantidad de enzima que se une a las partículas de cromo y se relaciona con la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.
- 10
- 15 Otro ejemplo específico de un formato de ensayo en donde se puede emplear el presente reactivo de ensayo seco es un ensayo de luminiscencia inducida como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,340,716. En un enfoque, el ensayo utiliza una partícula que incorpora un fotosensibilizador y una partícula etiquetada que incorpora un compuesto quimioluminiscente. La partícula marcada se conjuga con un miembro sbp que es capaz de unirse a un analito para formar un complejo, o a un segundo miembro sbp para formar un complejo, en relación con la presencia del analito. Si el analito está presente, el fotosensibilizador y el compuesto quimioluminiscente se acercan mucho. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente cuando las dos etiquetas están muy cerca. El compuesto quimioluminiscente activado produce posteriormente luz. La cantidad de luz producida se relaciona con la cantidad del complejo formado, que a su vez se relaciona con la cantidad de analito presente. En este caso, el reactivo de ensayo seco de acuerdo con la presente divulgación comprende una partícula marcada a la que se une un receptor, por ejemplo, estreptavidina, y un conjugado-ligando, por ejemplo, biotina-anticuerpo, conjugado se une al soporte mediante la unión de la estreptavidina sobre el soporte y la biotina del conjugado. El miembro sbp es el referido anteriormente que es capaz de unirse al analito.
- 20
- 25

Descripción general de la preparación de compuestos

- 30 El Chemibead EPRM se prepara de una manera similar al método descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 6,153,442. El Chemibead EPRM comprende una capa interna de aminodextrano y una capa externa Dexal que tiene funcionalidades de aldehído libre. El Dexal es aldehído dextrano; véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,929,049 y 7,172,906. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 40°C, durante un período de aproximadamente 16 a aproximadamente 64 horas a un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7.0, o aproximadamente 6, en un medio acuoso regulado que emplea un regulador adecuado, tales como, por ejemplo, MES o similares. La reacción se detiene mediante la adición de un agente de extinción adecuado tal como, por ejemplo, carboximetoxixima (CMO), o similar y posterior lavado de las partículas.
- 35

- 40 El Chemibead APRM es una perla de poliestireno con europio quelado y tioxeno como la composición quimioluminiscente. El Chemibead APRM se prepara de una manera similar al método descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 6,153,442. El Chemibead APRM comprende una capa de aminodextrano que tiene funcionalidades de amina libre.

- 45 Preparación de reactivo de partículas quimioluminiscentes de anticuerpo CsA. La preparación de conjugados de anticuerpo CsA y partículas se puede llevar a cabo de acuerdo con las siguientes realizaciones. Por ejemplo, EPRM-anti-CsA-anticuerpos-quimiotipo (19) se prepara en regulador (por ejemplo, MES, pH = 6.0, Neo Water (83%) y regulador MES (50 mM), o similar) con aminación reductiva de grupos de amina libre del anticuerpo con grupos aldehído de Chemibead EPRM en presencia de NaBH_3CN (Figura 10, Esquema 6) en condiciones de aminación reductiva como se discutió anteriormente. Cualquier grupo aldehído restante de ERPm se extingue como se describió anteriormente y las partículas resultantes se lavan como se discutió anteriormente.

- 50 Preparación de conjugados CsA-bis-biotina. En algunas realizaciones, puede prepararse una CsA-bis-biotina (31) a modo de ilustración y no de limitación. La preparación de CsA-bis-biotina (31) se puede lograr, por ejemplo, utilizando dos asociados de unión, el enlazante de bis-biotina (26) y el derivado de CsA (30) (Figuras 20-22, Esquemas 11-13). Una ruta sintética para la preparación de 26 se lleva a cabo en un total de cinco pasos. (Una preparación del compuesto (26) se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,153,442. Sin embargo, la síntesis previa de 26 requirió diez etapas de reacción. La metodología de síntesis descrita en este documento es más eficiente y económica que la síntesis previa). En las presentes realizaciones, la síntesis de 26 comienza con la protección selectiva de una amina en DA-10 con un agente de protección adecuado tal como, por ejemplo, t-butilo anhídrido, o similar para dar el compuesto (23) (Figura 11, Esquema 7). La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, cloruro de metileno, DMF o similares, a una temperatura de aproximadamente 0°C a aproximadamente 5°C, durante un período de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas a una temperatura ambiente, pH de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 13. Acilación de 23 con N-benciloxicarbonil-5-aminopentanoico anhídrido en condiciones
- 55
- 60

básicas. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 80°C, durante un período de aproximadamente 3 a aproximadamente 16 horas en condiciones básicas a un pH de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 11, tal como, por ejemplo, en presencia de trietilo. amina (Et₃N), diisopropiletilamina, y similares en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, cloruro de metileno, acetonitrilo (AcCN), DMF, THF, éter dietílico y similares. La reducción de los grupos nitro a amina se lleva a cabo utilizando un agente reductor adecuado como, por ejemplo, NaBH₄ o Cu (I) acetil acetona o NaBH₄, HCl o 10% de Pd en carbono, o similar, da un compuesto de diamina (24). Se eligen las condiciones de reacción que sean apropiadas para el agente reductor particular empleado. La reacción de la diamina (24) con un enlazante comercialmente disponible, por ejemplo, sulfo-NHS-LC-Biotina, NHS-PEO₄-biotina o similares, proporciona el compuesto (25). La desprotección selectiva del grupo protector t-Boc de 25 en condiciones ácidas tales como, por ejemplo, ácido trifluoroacético, un ácido mineral, por ejemplo, HCl, etc., o similares en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, cloruro de metileno. DMF, o similar, proporciona el enlazante de bis-biotina deseado (26) (Figura 11, Esquema 7).

La síntesis de 30 se representa en la Figura 12, Esquema 8. El compuesto 27 se trata para obtener un éster activado usando un agente de activación tal como, por ejemplo, isocianooacetato de etilo, o similares, en condiciones apropiadas para el agente de activación. Por ejemplo, con isocianooacetato de etilo como agente de activación, la reacción se lleva a cabo con etóxido de tributilestaño en tolueno a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 40°C, durante un período de aproximadamente 2 a aproximadamente 16 horas, para dar el éster (28). La hidrólisis del éster etílico y la desprotección del grupo protector de silicio en 28 se logra en una reacción de una etapa para dar ácido (29) por tratamiento en condiciones básicas como, por ejemplo, carbonato de sodio, carbonato de potasio, hidróxido de sodio o como, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo, metanol, etanol, etc., o por tratamiento en condiciones ácidas como, por ejemplo, ácido mineral diluido como se discutió anteriormente.

El grupo ácido en 29 se activa por tratamiento con un agente de activación tal como, por ejemplo, NHS y DCC, carbodiimida, o similares, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un éter, por ejemplo, THF, DMF, o similar, para dar éster NHS (30) (Figura 12, Esquema 8). La reacción anterior se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 40°C, durante un período de aproximadamente 3 a aproximadamente 16 horas. La reacción de acoplamiento de 30 con 26 se lleva a cabo en condiciones básicas tales como, por ejemplo, trietilamina, diisopropiletilamina, o similares en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un éter, por ejemplo, THF, DMF, diclorometano, o similar para dar el producto final, CsA-Bis-Biotina (31) (Figura 13, Esquema 9). La reacción de acoplamiento se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 40°C, durante un período de aproximadamente 4 a aproximadamente 16 horas a un pH de aproximadamente 9 a aproximadamente 11.

Kits que comprenden reactivos para realizar ensayos para un analito

Los reactivos para realizar un ensayo particular pueden estar presentes en un kit útil para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito. En algunas realizaciones, un kit comprende en combinación envasada un reactivo de ensayo seco como se describe anteriormente, así como cualquier otro reactivo para realizar el ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular.

Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o se pueden combinar varios reactivos 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 realizar un ensayo, como miembros sbp adicionales, reactivos auxiliares, etc.

Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimizan sustancialmente las reacciones que deben ocurrir durante el presente método y además para optimizar sustancialmente la sensibilidad del ensayo. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente.

Ejemplos

Comentarios generales

La cromatografía analítica de capa fina (TLC, sílice) es el método de análisis habitual y se realizó utilizando placas de Analtech, Inc. (Newark, DE) con el disolvente especificado a continuación. Las manchas de TLC se visualizaron mediante luz ultravioleta (onda corta y/u onda larga) y/o vapores de yodo. Las separaciones de cromatografía preparativa de capa fina (PTLC) se llevaron a cabo en placas de gel de sílice recubiertas previamente, de Whatman Inc. (Clifton, NJ) y Analtech Inc. La cromatografía instantánea se llevó a cabo en gel de sílice Whatman 60 Å (malla 230-400) (Whatman Inc., Florham Park, NJ). Los reactivos y disolventes fueron de calidad comercial y se utilizaron sin purificación adicional. El sirolimus (rapamicina) se obtuvo de BioAge Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA. FK-506-CMO (11) se obtuvo de Glasgow Site, Siemens Medical Solutions Diagnostics. A menos que se especifique lo contrario, los reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis MO), Aldrich Chemical Company (Milwaukee WI) o Fluka Chemical Corporation (Milwaukee WI) y se usaron tal como se recibieron. La perla sensibilizadora de estreptavidina se preparó de forma análoga a la descrita en las Patentes de los Estados Unidos

Nos. 6,153,442, 7,022,529 y 7,229,842. Los ensayos se realizaron utilizando el analizador DIMENSION® RxL disponible en Dade Behring Inc., Newark DE. El instrumento se empleó utilizando tecnología de inmunoensayo de luminiscencia inducida y se equipó con un lector apropiado.

Preparación de compuestos

5 Preparación de los compuestos (2) y (3) (véase la figura 2, esquema 1). A una solución de sirolimus (1) (1 g, 1.0545 mmol) y hemihidrocloruro de carboximetoxiamina (CMO) (823 mg, 3.16 mmol) en metanol (MeOH) (41 mL), se agregó acetato de sodio (263.0 mg, 3.18 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante una noche y el avance de la reacción se controló por TLC (gel de sílice) (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/9) (MeOH es metanol). Se agregaron agua desionizada (40 mL) y cloruro de metileno (40 mL) a la mezcla. La capa acuosa se extrajo con cloruro de metileno (3 x 40 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua desionizada (20 mL), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. Esto dio el producto crudo (1.0774 g). La purificación del producto crudo (148.8 mg) con tres placas de TLC preparativa (gel de sílice, 150 Å, 1000 µm, Whatman) (acetato de etilo (EtOAc)/Hexano/MeOH) = 5/2/1 se realizó para dar dos compuestos (2) (32.6 mg, 45% de rendimiento) y (3) (39.4 mg, 55%). (2).

15 Preparación de compuestos de biotina Rapa-C26/C32-PEO₄ (4) y (5) (véase Figura 3, Esquema 2). A una solución de los compuestos (2, 3) (50 mg, 0.05065 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (5 mL) se agregaron N-hidroxisuccinimida (NHS) (26 mg, 0.226 mmol) y N,N-diciclohexil carbodiimida (DCC) (50 mg, 0.2422 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y el producto rapamicina (Rapa)-NHS éster fue una mancha menos polar que el compuesto (2, 3). El avance de la reacción se controló por TLC (gel de sílice, CH₂Cl₂/MeOH = 1/9). Se formó un sólido blanco durante la reacción y se separó por filtración y el filtrado de THF se añadió con diisopropil etil amina (DIPEA) (0.06 ml) y una solución de Biotin-PEO-LC-Amine (Pierce Chemical Company, Rockford, IL 61105) (50 mg, 0.119 mmol) en dimetilformamida (DMF) (3 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mayor parte de THF y DMF se eliminó mediante evaporación rotatoria a alta presión. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (0.5 ml) y la solución resultante se aplicó a placas de TLC preparativas (gel de sílice, 2000 µm, 20 cm x 20 cm, Analtech). La purificación del producto crudo con placas de PTLC (CH₂Cl₂/MeOH = 1/9) se realizó para dar los dos isómeros deseados (4) y (5) (48 mg): el análisis por HPLC de los isómeros mostró que la relación molar de (4) a (5) es 1 a 1.5.

30 Preparación de Rapa-C26-PEO₄-Biotina (4) (véase Figura 4, Esquema 3). A una solución de (2) (12 mg, 0.0122 mmol) en THF (2 mL) se agregaron N-hidroxisuccinimida (NHS) (6 mg, 0.052 mmol) y N,N-diciclohexil carbodiimida (DCC) (8 mg, 0.0387 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y el producto rapamicina (Rapa)-NHS éster fue una mancha menos polar que el compuesto (2). El avance de la reacción se controló por TLC (gel de sílice, CH₂Cl₂/MeOH = 1/9). Se formó un sólido blanco durante la reacción y se separó por filtración y se añadió el filtrado de THF con DIPEA (0.02 ml) y una solución de Biotin-PEO-LC-Amina (15 mg, 0.035 mmol) en DMF (0.3 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mayor parte del THF y el DMF se eliminó mediante evaporación rotatoria a alta presión. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (0.2 ml) y la solución resultante se aplicó a placas de TLC preparativas (gel de sílice, 2000 µm, 20 cm x 20 cm, Analtech). La purificación del producto crudo con placas de PTLC (CH₂Cl₂/MeOH) = 9/1 se realizó para dar los isómeros puros (4) (5,2 mg). El análisis de HPLC de 4 mostró que tiene un tiempo de retención de 3.6 minutos.

40 Preparación de Rapa-C32-PEO₄-Biotina (5) (véase Figura 4, Esquema 3). A una solución de (3) (39 mg, 0.05065 mmol) en THF (3 ml) se agregaron N-hidroxisuccinimida (NHS) (12 mg, 0.104 mmol) y N,N-diciclohexil carbodiimida (DCC) (22 mg, 0.106 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y el producto rapamicina (Rapa)-NHS éster es una mancha menos polar que el compuesto (3). El avance de la reacción se controló por TLC (gel de sílice, CH₂Cl₂/MeOH = 1/9). El sólido blanco, que se formó durante la reacción, se filtró y el filtrado de THF se añadió con DIPEA (0.04 ml) y una solución de Biotin-PEO-LC-Amina (40 mg, 0.095 mmol) en DMF (0.4 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mayor parte del THF y el DMF se eliminó mediante evaporación rotatoria a alta presión. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (0.4 ml) y la solución resultante se aplicó a placas de TLC preparativas (gel de sílice, 2000 µm, 20 cm x 20 cm, Analtech). La purificación del producto crudo con placas de PTLC (CH₂Cl₂/MeOH = 9/1) se realizó para obtener el isómero puro (5) (40 mg): el análisis por HPLC de 5 mostró que tiene un tiempo de retención de 2.6 minutos. Espectro de masas para la fórmula: C₇₁H₁₁₄N₆O₁₉S (5) (FAB; m/e: MN⁺, 1409.9).

55 Preparación de dióxido de cromo Siro-Dexal preformado (10) (véase la figura 5, esquema 4). CPRM (7) (preparado como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,661,408) (120 mL) se combinó con una solución reguladora MES (50 mM, pH 6.0; 3 x 200 mL) a 6000 rpm durante 2 minutos y se resuspendió hasta un volumen total de 120 mL con el mismo regulador. El CPRM se centrifugó a 3500 rpm durante 12 minutos después de cada lavado. Se añadió una solución de Dexal (180 mL) al CPRM (120 ml) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos y el pH se ajustó a 6.0 con HCl 1N en caso necesario. Se disolvió cianoborohidruro de sodio (614 mg) en 2 mL de agua desionizada y se ajustó con el agua desionizada hasta un volumen total de 3 ml. La solución resultante (3 mL) se añadió gota a gota a la mezcla (120 ml CPRM + 180 ml de Dexal) mientras se agitaba y la mezcla de reacción se agitó usando un Nutator ADAMS® a temperatura ambiente durante 64 ± 4 horas durante el fin de semana. El Dexal-cromo se centrifugó a 3500 rpm durante 12 minutos y se eliminó el sobrenadante. El Dexal-cromo se resuspendió en regulador de fosfato (200 ml, pH = 7, 100 mM) y se lavó a 6000 rpm durante 2 minutos

(mezclador L4RT-W® (Silverson Machines Inc., East Longmeadow MA). El Dexal-cromo se centrifugó a 3500 rpm durante 12 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se repitió todo el proceso con el Dexal-cromo con regulador fosfato (100 mM, pH = 7, 4 x 200 ml), agua desionizada (5 x 200 mL) y luego regulador MES (5 x 200 ml, 50 mM, pH = 6.0). El producto de Dexal-dióxido de cromo (8) se suspendió en 100 mL del mismo regulador MES para la siguiente reacción.

5

La estreptavidina (SA) (1200 mg, polvo liofilizado, 70% de pureza) se disolvió en 12 mL de agua desionizada y se añadió a la suspensión del producto de Dexal-dióxido de cromo (8) (cromo) (100 ml) de arriba. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se disolvió cianoborohidruro de sodio (300 mg) en agua desionizada (8 mL) y la solución de cianoborohidruro de sodio se añadió gota a gota al producto de Dexal-dióxido de cromo (8) (100 ml) mientras se agitaba. La mezcla de reacción se agitó a 37°C durante 64 ± 4 horas durante el fin de semana. Se añadió una solución de CMO 1M (1.2 ml) al cromo y la mezcla se agitó a 37°C durante 2 horas. El producto de Dexal-dióxido de cromo SA (9) se centrifugó a 3500 rpm durante 12 minutos y se eliminó el sobrenadante. El producto de Dexal-dióxido de cromo SA (9) se resuspendió en regulador fosfato (200 ml, pH = 7.0, 100 mM) y se lavó (L4RT-W® Mixer) a 6000 rpm durante 2 minutos y luego se centrifugó a 3500 rpm durante 12 minutos y el sobrenadante fue eliminado. Todo el proceso se repitió con el regulador fosfato (14 x 200 ml, pH = 7.0, 100 mM) catorce veces. El producto de Dexal-dióxido de cromo SA (9) se resuspendió a un volumen total (120 ml) con el mismo regulador fosfato. En esta preparación de cromo, se detectaron 7.53×10^{-9} moles (SA)/ml (5% de sólido de cromo).

10

15

Sirolimus-biotina (4, 5) (2.1 mg, 0.0015 mmol) se disolvió en MeOH (0.5 ml) y se añadió a regulador fosfato (9.5 ml, pH = 7.0, 100 mM). La solución de sirolimus-biotina (10 ml) se añadió gota a gota al Dexal-dióxido de cromo SA (9) (100 ml, 7.53×10^{-9} , 0.000753 mmoles) mientras se agitaba y se empleó papel de aluminio para proteger la mezcla de la luz. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 ± 4 horas. La relación molar de biotina a SA fue de 2 a 1. La biotina-Siro-Dexal-cromo preformada se centrifugó a 3500 rpm durante 12 minutos y se eliminó el sobrenadante. El producto de biotina-Siro-Dexal-cromo se resuspendió en regulador fosfato (200 ml, pH = 7.0, 100 mM) y se lavó (L4RT-W® Mixer) a 6000 rpm durante 2 minutos. La biotina-Siro-Dexal-cromo se centrifugó a 3500 rpm durante 12 minutos y se eliminó el sobrenadante. El proceso completo se repitió con el regulador fosfato (10 x 200 ml, pH = 7.0, 100 mM) y el regulador PIPES (5 x 200 ml, pH = 6.50, 50 mM). El producto resultante se suspendió hasta un volumen total (100 ml) con el mismo regulador PIPES. El volumen total se ajustó al 5% para obtener el Siro-biotina::estreptavidina-Dexal-dióxido de cromo preformado (10) (referido en la Figura 5 como "SIRO CrO₂ (10) precargado", que se usó para secar tabletas de cromo como se describe a continuación.

20

25

Preparación de Tacrolimus-PEO4-Biotina (12) (véase Figura 6, Esquema 5). A una solución de FK-506-CMO (11) (75 mg, 0.0855 mmol) en THF (5 mL) se agregaron N-hidroxisuccinimida (NHS) (20 mg, 0.173 mmol) y N,N-diciclohexil carbodiimida (DCC) (45 mg, 0.218 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y el producto, tacrolimus-NHS éster, fue un punto menos polar que el compuesto (11). El avance de la reacción se controló por TLC (gel de sílice, CH₂Cl₂/MeOH = 1/9). El sólido blanco formado durante la reacción se separó por filtración y el filtrado de THF se añadió con DIPEA (0.02 ml) y una solución de Biotin-PEO-LC-Amina (50 mg, 0.119 mmol) en DMF (0.5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mayor parte de THF y DMF se eliminaron mediante evaporación rotatoria a alta presión. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (0.2 ml) y la solución resultante se aplicó a placas de TLC preparativas (gel de sílice, 2000 µm, 20 cm x 20 cm, Analtech). La purificación del producto crudo con placas de PTLC (CH₂Cl₂/MeOH) = 9/1 se realizó para dar los isómeros puros (12) (124 mg).

30

35

40

Preparación de comprimidos de sirolimus biotinilado::estreptavidina Dexal dióxido de cromo a una relación molar de 2 (biotina):1 (estreptavidina). El núcleo de las partículas de dióxido de cromo se recubrió primero con sílice y luego se recubrió con un silano de acuerdo con el procedimiento descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 4,661,408. Los grupos amina en el silano se hicieron reaccionar primero con aldehído de dextrano (PM = 500 KD) en un regulador MES, pH 6.0 en presencia de NaBH₃CN para formar una capa de dexal recubierta en la superficie de cromo (véase esquema 4). El Dexal-cromo se hizo reaccionar con estreptavidina en las mismas condiciones para formar cromo recubierto con estreptavidina como se describe anteriormente. El sirolimus biotinilado fabricado como se describe anteriormente se incubó luego en una relación molar 2:1 con estreptavidina durante 48-64 horas. La suspensión de cromo se lavó con regulador fosfato de Na 100 mM, pH 7.0 por 10 veces y luego en regulador PIPES 50 mM, pH 6.5 por 5 veces. La suspensión de cromo lavada se dejó reposar durante 8 horas o hasta que el sobrenadante se aclaró. El sobrenadante se retiró cuidadosamente para recoger la suspensión de cromo. Una solución que contenía 8% (p/p) de carbowax (PEG 8000) y 84% (p/p) de trehalosa se añadió lentamente a la suspensión de cromo, que se mezcló con un mezclador de hélice. La solución se mezcló durante 10 minutos antes de cargarla en un conjunto de aspersión (Patentes de los Estados Unidos No. 4,712,310, 4,678,812, 3,932,943, 3,721,725). La presión de nitrógeno líquido (LN₂) para el Snow-gun se mantuvo para alcanzar una salida de temperatura del producto dentro del rango de -140°C a -175°C (la presión esperada de LN₂ fue de 22-32 psi). La solución de pulverización se pulverizó a través de boquillas Egg-Crate para formar gotitas finas uniformes (no todas están congeladas). Las gotitas se recogieron y se terminaron para congelar en una bandeja, que contenía LN₂. Después de que se terminó la pulverización de la solución con Snow Gun, la mezcla resultante (gotitas congeladas o gránulos) se transfirió y cargó inmediatamente en un secador de congelación Hull previamente enfriado (<-35°C, SP Industries, Inc, Warminster, PA), donde se liofilizó durante 5 días hasta que se convirtió en polvo de mezcla seca. Luego se recogió el polvo de la mezcla seca y se prensó en tabletas de cromo de 30 mg utilizando una prensa de tabletas de estación única (Advanced Machinery, MI 48035).

45

50

55

60

Preparación de suspensión de Rapamicina-DA10-Dexal-Chrome. La suspensión de rapamicina-DA10-Dexal-cromo se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 7,189,582. La suspensión de suspensión de cromo lavada se dejó reposar durante 8 horas o hasta que el sobrenadante se aclaró. El sobrenadante se retiró cuidadosamente para recoger las partículas de cromo. Una solución que contenía 8% (p/p) de carbowax (PEG 8000) y 84% (p/p) de trehalosa se añadió lentamente a la suspensión de cromo, que se mezcló con un mezclador de hélice. La solución se mezcló durante 10 minutos y luego se liofilizó y se formó en tabletas como se describió anteriormente.

Preparación de EPRM-anti-CsA-Ab-Chemibead (19). Véase la Figura 10. A la suspensión de Chemibead EPRM (2 ml, 100 mg/ml) se agregaron 2 ml de solución de anticuerpo anti-CsA (2G4, IgG1) (20 mg/ml) en regulador MES (50 mM, 1 ml, pH = 6.0) en una sala verde evitando la luz del día. A esta suspensión se le agregaron 0.09 ml de solución de NaCNBH₃ (25 mg/ml). La mezcla de reacción se agitó en un Nutator ADAMS a 37°C durante 63 horas. Se añadió una solución de 1M CMO (0.25 mL) a la mezcla, que se agitó a 37°C durante 2.5 horas. La mezcla se centrifugó a 15 000 rpm durante 25 minutos y el sedimento se resuspendió por sonicación con 30 ml de regulador fosfato (50 mM, pH = 8.0). El proceso de lavado se repitió (13 x 30 ml) con el mismo regulador y (5 x 30 ml) con el regulador de suspensión (HEPES 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, BSA 1 mg/ml, TX-405 al 0.1%, Proclin 300 al 0.15%, 0.1 mg/ml de sulfato de neomicina, pH = 8.0). El compuesto químico anti-CsA-Ab EPRM (19) se resuspendió en 5 ml del mismo regulador de suspensión y se determinó que el % de sólido era de 28.3 mg/ml.

Preparación del compuesto (23). El Compuesto (23) se preparó mediante métodos similares a los descritos previamente en la Patente de los Estados Unidos No. 6,153,442.

Preparación del compuesto (24). El Compuesto (24) se preparó de la siguiente manera: Véase Figura 20. A una solución de (23) (10 g, 40.7 mmol) en THF (100 ml) se añadió gota a gota Et₃N (4.6 g) y cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo (9.2 g, 39.9 mmol) en THF (100 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mayor parte del THF se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (200 ml) y se añadió agua (120 ml). La mezcla se vertió en un embudo de separación y se extrajo con HCl 0.2N (2 x 100 ml), carbonato de sodio 0.1N (2 x 50 ml) y agua (1 x 100 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se sometió a alto vacío para dar el intermedio (15.5 g) como un aceite viscoso. Este intermedio (486 mg, 1.1 mmol) se disolvió en etanol (EtOH) (30 ml) que contenía Pd al 10% sobre carbono (400 mg). La mezcla se burbujeó con nitrógeno durante 20 minutos para eliminar el oxígeno de la solución. A esta solución se añadió borohidruro de sodio (400 mg) bajo nitrógeno y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió gota a gota HCl (1N, 1 ml) a la mezcla (Precaución: se formó hidrógeno a partir de la reacción) en atmósfera de nitrógeno (10 minutos). La mezcla se agitó durante 30 minutos. Se añadió 1 ml adicional de HCl (1N) a la mezcla, que se agitó durante 30 minutos adicionales, seguido de una adición más de 1 ml de HCl (1N). La mezcla se agitó durante 120 minutos y se burbujeó con nitrógeno durante 10 minutos. El etanol se filtró con celite y el celite se lavó con etanol (2 x 10 ml). El etanol combinado se concentró a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna (gel de sílice) usando MeOH/CH₂Cl₂ (1/9) para dar el producto deseado (24) (264 mg).

Preparación del compuesto (25). Véase la Figura 20. A una solución de 24 (88 mg, 0.23 mmol) en THF (10 ml) se agregó Et₃N (0.3 mL) y sulfo-NHS-LC-biotina (15) (260 mg, 0.467 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añadió a la mezcla sulfo-NHS-LC-biotina adicional (125 mg, 0.224 mmol) y Et₃N (0.15 ml). La mezcla se agitó durante 5 horas adicionales. La mayor parte del THF se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo se disolvió en MeOH/CH₂Cl₂ (1/9) (0.3 ml) y la solución se aplicó a una placa de TLC preparativa (Analtech, número de catálogo: 02015, gel de sílice, 2000 µm). La TLC se desarrolló en un disolvente mixto (MeOH/CH₂Cl₂ = 2/8) y la banda principal se recogió y se extrajo con (MeOH/CH₂Cl₂ = 3/7) (50 ml). El disolvente se evaporó a sequedad y el residuo se puso en alto vacío para dar el producto deseado (25) (39 mg).

Preparación del compuesto (26). Véase la Figura 20. A una solución del compuesto (25) (39 mg, 0.0367 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml) se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (1.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. El análisis por TLC de la reacción mostró que el material de partida (25) desapareció y se mostró una nueva mancha más polar (gel de sílice, acetato de etilo). La mayor parte del CH₂Cl₂ y TFA se eliminaron por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo se puso en 20 ml de hexano y 15 ml de CH₂Cl₂. El disolvente se evaporó a sequedad nuevamente para eliminar un rastro de TFA y el residuo se puso a alto vacío durante 2 horas. Esto dio el producto deseado (26) usado para la siguiente reacción sin purificación adicional.

Preparación del intermedio CsA (28). Véase la Figura 21. A una solución del compuesto (27) (240 mg, 0.1819 mmol) en tolueno (3 mL) se añadió etóxido de tributilestaño (112 mg, 0.112 ml, 0.0969 mmol) bajo nitrógeno. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A esta solución se añadió isocianatoacetato de etilo (73 µL, 84 mg, 0.652 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El análisis por TLC de la reacción mostró que el material de partida (27) desapareció y se mostró una nueva mancha menos polar (gel de sílice, MeOH/acetato de etilo = 3/97). Se añadió agua (10 ml) y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 30 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (30 ml) y salmuera (30 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía instantánea en columna (gel de sílice) usando MeOH/acetato de etilo (3/97) para dar el producto deseado (28) (224 mg).

Preparación de intermedio CsA (29). Véase la Figura 21. A una solución del compuesto (28) (112 mg, 0.0774 mmol) en MeOH (6.0 ml) y H₂O (0.5 ml) se agregó K₂CO₃ (140 mg, 1.01 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió agua (10 ml) y se añadió HCl (1N) a la mezcla para ajustar el pH a 1. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos. La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera/agua (1/1) (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se puso a alto vacío durante 16 horas. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂/MeOH (2/8) (0.5 ml) y la solución se aplicó a una placa de THC preparativa (Analtech, número de catálogo: 02015, gel de sílice, 2000 µm). La TLC se desarrolló en un disolvente mixto (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/9) y la banda principal se recogió y se extrajo con (MeOH/CH₂Cl₂ = 3/7) (50 ml). El disolvente se evaporó a sequedad y el residuo se puso en alto vacío bajo P₂O₅ durante 16 horas para dar el producto deseado (29) (55.6 mg).

Preparación de CsA-Bis-Biotina (31). Véanse las figuras 21-22. A una solución del compuesto (29) (55.6 mg, 0.04125 mmol) en THF (5 mL) se añadió DCC (20 mg, 0.0969 mmol) y NHS éster (15 mg, 0.13 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante 6 horas. El análisis por TLC de la mezcla mostró que se mostraba una mancha menos polar en comparación con el compuesto (29) (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/9). El precipitado de la reacción se separó por filtración y se lavó con THF anhidro (3 ml). La fase orgánica combinada se evaporó a sequedad para dar el hapteno activado (30), que se disolvió en DMF (1 ml) para la siguiente reacción.

El Compuesto (26) (Figura 20) se disolvió en DMF (5 ml) y Et₃N (0.1 ml). A esta solución se añadió el hapteno activado (30) en solución DMF (1 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mayor parte del DMF se eliminó mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo se sometió a alto vacío durante 2 horas para dar el producto crudo (31). El producto crudo se disolvió en 0.3 ml de MeOH/CH₂Cl₂ (1/9) y la solución se aplicó a dos placas de THC preparativas (Analtech, número de catálogo: 02015, gel de sílice, 2000 µm). La TLC se desarrolló utilizando un disolvente mixto (MeOH/CH₂Cl₂ = 1/9) y la banda principal se recogió de dos placas de TLC y se extrajo con (MeOH/CH₂Cl₂ = 2/8) (50 ml). El disolvente se evaporó a sequedad y el residuo se puso en alto vacío para dar el producto deseado (31) (54 mg).

Preparación de perlas sensibilizadoras preformadas con CsA-bis-biotina (34). CsA-Bis-Biotina (31) (1.15 mg) se disolvió en MeOH (0.2 ml) y se añadió en un regulador (49.8 ml, HEPES 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, BSA 1 mg/ml, TX-405 al 0.1%), Proclin 300 al 0.15%, 0.1 mg/ml de sulfato de neomicina, pH = 8.0). Esto hace 50 ml de 10 µM de solución de CsA-Bis-Biotina. A 5 ml de perlas sensibilizadoras recubiertas con estreptavidina (SA) (véanse las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,153,442; 7,022,529; 7,229,842) (1 mg/ml, carga total de SA: 3.94 nmoles) se añadió solución de CsA-bis-biotina. (49.3 µl, 10 µM, 0.493 nmoles). La relación molar de SA a CsA-Bis-Biotina fue de 1:0.125. La perla sensibilizadora preformada se incubó a temperatura ambiente en una cabina evitando la luz del día durante 1 hora. La perla se diluyó en un volumen total de 10 ml con el mismo regulador para tener una suspensión de perlas de 0.5 mg/ml. Las perlas se almacenaron a 4°C. Este procedimiento se usó para preparar diferentes relaciones molares de SA a perlas sensibilizadoras preformadas con CsA-bis-biotina (34) para su evaluación.

35 Estudios de estabilidad

Comparación de la estabilidad hidratada de las tabletas de cromo preformadas con la de la rapamicina-DA10-Dexal-cromo en un período de 64 horas. El cartucho de reactivos DIMENSION® FLEX® para el ensayo ACMIA sirolimus contenía cuatro reactivos en pozos separados, 2.5 mL de reactivo de pretratamiento (R1), 1.8 mL de anticuerpo anti-sirolimus (conjugado de β-galactosidasa (R2), cuatro tabletas preformadas o rapamicina-DA10 de Dexal-cromo hidratadas con 1.9 mL de agua (R3) usando una sonda de ultrasonido y 1.8 mL de solución de CPRG (R4). Cada prueba individual consumió 70 µL de R1, 50 µL de R2, 50 µL de R3 (cromo) y se diseñaron 155 µL de R4 y la cantidad de reactivo en cada pozo para 10 pruebas. El volumen adicional de reactivo en cada pozo proporcionó el volumen muerto y también reguló el cambio de concentración debido a la condensación y la evaporación después de que los pozos fueron perforados por la sonda de reactivo (se abrieron bien) y las tabletas se hidrataron. Se empleó un protocolo de agotamiento lineal para realizar los estudios de estabilidad del cromo hidratado. En este protocolo, se utilizaron seis de las diez pruebas en cada pozo para generar los resultados de referencia en la hora 0 utilizando un material de control de calidad. (sangre entera QC nivel 2 de More Diagnostics Inc., Los Osos CA). Después de que los pozos de reactivo se perforaron y las tabletas de cromo se hidrataron durante 64 horas, se utilizaron los ensayos sobrantes para medir la concentración de sirolimus en el material de control de calidad. El cartucho de reactivos FLEX® que contiene las tabletas de cromo preformadas comparte los mismos otros reactivos que el que contiene las tabletas de rapamicina-DA10-Dexal-cromo. La Tabla 1 resume una comparación de las recuperaciones de CC usando el cromo preformado en comparación con el uso de la rapamicina-DA10-Dexal-cromo.

Tabla 1

Comparación de la estabilidad hidratada Recuperación de QC de CrO ₂ predecorado versus rapamicina-DA10-dexal-CrO ₂			
Tabletas de CrO ₂	ng/mL Hora 0	ng/mL Hora 64	Δ
Tabletas PD CrO ₂ 1967-88	11.3	10.9	-0.4
Rapamicina-DA10-Dexal-CrO ₂ Lote A	11.3	14.2	2.9
Rapamicina-DA10-Dexal-CrO ₂ Lote B	11.3	14.1	2.8

Los resultados en la tabla anterior demuestran que el cromo preformado hidratado era más estable que la rapamicina-DA10-cromo hidratada.

5 Estudio de siete días de la estabilidad hidratada de las tabletas de cromo preformadas en el analizador DIMENSION® VISTA®. El ensayo de sirolimus DIMENSION® VISTA® empleó el mismo formato y principio que el utilizado en los
 10 módulos DIMENSION® RxL HM como se describió anteriormente. El principio y el funcionamiento del método de sirolimus en el analizador DIMENSION® VISTA® fueron los siguientes: 32 µL de reactivo de pretratamiento que
 15 contiene los surfactantes y se agregó un compuesto de carbamato FK506 al recipiente de reacción en el instrumento de química DIMENSION® RxL/HM. A continuación, se añadieron 8.5 µL de sangre entera que contenía sirolimus. Se
 20 tomó una muestra de la sangre entera de una taza estándar mezclando primero la sangre dispuesta. La mezcla de la muestra de sangre entera con la solución de pretratamiento que contiene los surfactantes y el compuesto de carbamato
 25 FK506 aseguró la lisis de la sangre entera y el desplazamiento de las moléculas de sirolimus unidas a proteínas de sus sitios de unión por las moléculas de carbamato de sirolimus. A continuación, se añadió conjugado de anticuerpo
 30 anti-sirolimus-β-galactosidasa (21.5 µL) y se dejó reaccionar con sirolimus en la muestra. Dos tabletas secas de 30 mg, cada una con 2.5 mg de partículas de cromo parcialmente preformadas descritas anteriormente, 8% (p/p) de
 35 trehalosa y 84% (p/p) carbowax (polietilenglicol 8000), se hidrataron con 950 µL de agua dispuesta con una sonda reactiva ultrasónica. Luego, se agregaron 21.5 µL de las partículas de cromo hidratadas a la mezcla de reacción y se
 dejó que se uniera al conjugado no reaccionado. El conjugado de anticuerpo anti-sirolimus-β-galactosidasa unido a sirolimus no se unió al cromo, sino que permaneció en el sobrenadante cuando se aplicó un campo magnético a la
 mezcla de reacción anterior para separar la solución de las partículas de cromo. El conjugado unido a sirolimus se detectó transfiriendo el sobrenadante del recipiente de reacción a una cubeta fotométrica y midiendo la velocidad
 enzimática del conjugado en presencia de CPRG. La velocidad se midió bicromáticamente a 577 y 700 nm.

El cartucho de reactivos DIMENSION® VISTA® FLEX® para el ensayo ACMIA sirolimus contenía cuatro reactivos en
 25 pozos separados, 830 µL de reactivo de pretratamiento (R1), 720 µL de conjugado de anticuerpo anti-sirolimus-β-galactosidasa (R2) o tabletas de cromo directamente enlazadas hidratadas con 950 µL de agua (R3) usando una
 sonda de ultrasonido y 1350 µL de solución de CPRG (R4). Cada prueba individual consumió 32 µL de R1, 21.5 µL
 30 de R2, 21.5 µL de R3 (cromo) y 60.5 µL de R4 y la cantidad de reactivo en cada pozo se diseñó para 10 pruebas. El volumen de reactivo adicional en cada pozo es para proporcionar el volumen muerto y regular el cambio de
 concentración debido a la condensación y la evaporación después de que los pozos se perforan con la sonda de
 35 reactivo (se abre bien) y las tabletas se hidraten. Se empleó un protocolo de agotamiento lineal para realizar los estudios de estabilidad de cromo hidratado. En este protocolo, se utilizaron dos muestras de sangre entera humana
 que contenían aproximadamente 6 y 18 ng/mL de sirolimus como muestras de prueba. Las pruebas en cada pozo que
 contenían cromo preformado hidratado se agotaron linealmente el día 0 (3 pruebas), el día 5 (2 pruebas) y el día 7 (3
 pruebas). La Tabla 2 muestra las recuperaciones estables de los dos grupos de sangre total durante el período de 7
 días.

Tabla 2

Estabilidad hidratada del CrO ₂ preformado en el analizador DIMENSION® VISTA®			
Día/ng/mL	Día 0	Día 5	Día 7
Acumulado 1	5.9	5.4	5.6
Acumulado 2	17.2	17.0	17.7

Los resultados en la tabla anterior demuestran una buena estabilidad hidratada para el cromo preformado durante un período de 7 días.

Ensayos

Los siguientes ensayos se realizaron usando reactivos como se describió anteriormente.

5 Ensayo de sirolimus. La medición de sirolimus se llevó a cabo utilizando el formato de ensayo conocido como ACMIA. El principio y el funcionamiento del método de ensayo de sirolimus fueron los siguientes: se agregaron 70 μL de reactivo de pretratamiento que contiene los surfactantes y un compuesto de carbamato FK506 al recipiente de reacción en el instrumento de química DIMENSION® RxL/HM con módulo HM. A continuación, se añadieron 18 μL de sangre entera que contenía sirolimus. Se tomó una muestra de sangre entera de una taza estándar mezclando primero la sangre con la sonda de muestra ultrasónica. La mezcla de la muestra de sangre entera con la solución de pretratamiento que contiene surfactantes y el compuesto de carbamato FK506 aseguró la lisis de la sangre entera y el desplazamiento de las moléculas de sirolimus unidas a proteínas de sus sitios de unión por las moléculas de carbamato de sirolimus. A continuación, se agrega conjugado de anticuerpo anti-sirolimus- β -galactosidasa (50 μL) y se deja reaccionar con sirolimus en la muestra. Cuatro tabletas secas de 30 mg de CrO_2 preparadas como se describió anteriormente, cada una de las cuales contenía 2.5 mg de partículas de cromo preformadas parcialmente o las partículas de rapamicina-DA10-Dexal-cromo como se describió anteriormente, 8% (p/p) de trehalosa y 84% (p/p) carbowax (polietilenglicol 8000), se hidrataron con 1900 μL de agua a bordo con una sonda de reactivo ultrasónico. Luego, se agregaron cincuenta μL de las partículas de cromo hidratadas a la mezcla de reacción y se dejó que se uniera al conjugado no reaccionado. El conjugado de anticuerpo anti-sirolimus- β -galactosidasa unido a sirolimus no se unió al cromo, sino que permaneció en el sobrenadante cuando se aplicó un campo magnético a la mezcla de reacción anterior para separar la solución de las partículas de cromo. El conjugado unido a sirolimus se detectó transfiriendo el sobrenadante del recipiente de reacción a una cubeta fotométrica y midiendo la velocidad enzimática del conjugado en presencia de rojo de clorofenol- β -D-galactopiranosido (CPRG). La velocidad se midió bicromáticamente a 577 y 700 nm. En la Figura 14 se muestra una curva estándar típica para el ensayo DIMENSION® sirolimus.

25 Ensayo de ciclosporina A. En esta realización, se determinó la cantidad de CsA en un medio sospechoso de contener CsA. Se proporcionó una combinación en un medio en donde la combinación comprende (i) la muestra, (ii) un reactivo preformado que comprende un fotosensibilizador asociado con una primera partícula y que es capaz de generar oxígeno singlete en donde la primera partícula comprende un asociado de unión a biotina unido a biotina como parte de un conjugado de ciclosporina A y biotina, y (iii) una composición quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y asociada con una segunda partícula en donde la segunda partícula comprende un anticuerpo para ciclosporina A. La combinación se sometió a condiciones para la unión de ciclosporina A al anticuerpo para la ciclosporina A. El fotosensibilizador se irradió con luz y se detectó la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente, relacionándose la cantidad de luminiscencia con la cantidad de ciclosporina A en la muestra.

35 Para el ensayo de ciclosporina A anterior, se emplearon los siguientes reactivos analizados anteriormente: perlas de fotosensibilizador de CsA-bis-biotina-estreptavidina como reactivo preformado (34) y Mab-Chemibeads anti-CsA (19). Las muestras fueron calibradores 1-5 como se discutió anteriormente. Los reactivos y las muestras apropiados se agregaron a un recipiente de reacción del analizador DIMENSION RxL de la siguiente manera: en el recipiente de reacción, se agregaron 20 μL de anti-CSA (2G4) Mab-Chemibeads seguido de 20 μL de diluyente (HEPES 50 mM pH 7.2, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, 1 mg/ml de Dextrano T-500, TRITON x-405 al 0.1%, Proclín 300 al 0.15%, neomicina al 0.1%) seguido de 15 μL de agua. Luego, se agregaron 10 μL de muestra seguido de 15 μL de agua. La combinación se incubó durante 219 segundos y se agregaron 20 μL de perlas de fotosensibilizador de CsA-bis-biotina-estreptavidina (31) seguidas de 150 μL de agua. La combinación se incubó durante 366 segundos o 713 segundos a una temperatura de 37°C. Luego, la combinación se irradió con luz a 680 nm durante un período de 0.2 a 1 segundo y la señal (en los recuentos de fotones denominada señal LOCI en las tablas a continuación) se leyó utilizando un lector (Perkin-Elmer CPM Detector). Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 3 y en la Figura 15.

Tabla 3

Perlas de CsA-bis-biotina-estreptavidina-fotosensibilizador (34)	
Calibrador	Señal LOCI
0.00	234
80.00	123
180.00	71

ES 2 712 487 T3

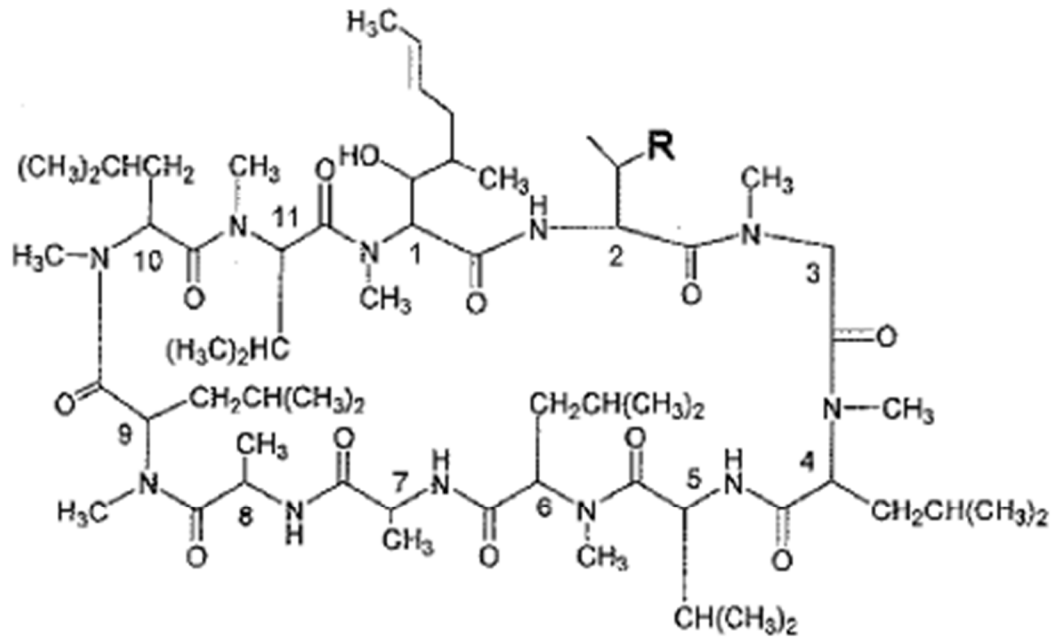
Perlas de CsA-bis-biotina-estreptavidina-fotosensibilizador (34)	
Calibrador	Señal LOCI
330.00	48
500.00	36

Como se puede ver en los datos anteriores, la cantidad de señal y una diferencia suficiente entre la señal para el calibrador 1 (0.00 ng/mL CsA) y el calibrador 2 (80.00 ng/mL CsA) se obtienen con el reactivo preformado. Esto da como resultado una buena sensibilidad en el rango de decisión médica como se discutió anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo de ensayo seco, comprendiendo dicho reactivo un soporte sólido en partículas y una o más moléculas de un receptor inmovilizado en el soporte sólido en partículas, en donde el receptor comprende de 2 a 7 sitios de unión para un ligando y en donde una porción de un número total de los sitios de unión está unida a un conjugado que comprende el ligando unido covalentemente a un miembro del par de unión específico (sbp) y una parte del número total de los sitios de unión está libre para capturar el conjugado miembro-ligando sbp no específicamente unido al soporte sólido y/o disociado del soporte sólido, en donde la relación molar del número total de sitios de unión del receptor al número de moléculas de ligando es de 1.5 a 4 y en donde el miembro del par de unión específico es un asociado de unión para un analito o un análogo de analito.
- 5
2. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el receptor es un receptor para una molécula pequeña.
- 10
3. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la molécula pequeña es biotina, dinitrofenol, digoxigenina, fluoresceína, una hormona o una cadena de ácido nucleico monocatenario.
4. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho reactivo comprende una o más moléculas de un asociado de unión a biotina inmovilizado en el soporte sólido en partículas, en donde una porción de un número total de sitios de enlace del asociado de enlace de biotina está unida a un conjugado que comprende biotina unida covalentemente a un miembro de par de unión específico y una porción del número total de sitios de unión es libre, en donde la relación molar del número total de sitios de unión del asociado de unión a biotina al número de moléculas de biotina es 1.5 a 4 y en donde el miembro de par de unión específico es un asociado de unión para un analito o un análogo de analito.
- 15
5. El reactivo según la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en donde la partícula es una partícula magnética.
- 20
6. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el asociado de unión a biotina es estreptavidina.
7. Un método para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito, comprendiendo el método:
- 25
- (a) proporcionar en combinación en un medio acuoso la muestra y los reactivos para detectar el analito, en donde al menos uno de los reactivos comprende el reactivo de ensayo seco de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, en donde el miembro de par de unión específica es un asociado de unión para el analito o un análogo de analito,
- (b) incubar la combinación en condiciones para la unión del analito a uno o más de los reactivos, y
- (c) detectar la presencia y/o cantidad de unión del analito a uno o más de los reactivos, estando la presencia y/o cantidad de la unión relacionada con la presencia y/o cantidad del analito en la muestra.
- 30
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el miembro de par de unión específico es un análogo de analito.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el miembro de par de unión específico es un anticuerpo para el analito.
- 35
10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde los reactivos incluyen un conjugado que comprende un anticuerpo para el analito unido a una enzima.

Figura 1. Estructuras de CsA y Csc



Ciclosporina A (CsA) : R = H (1);
Ciclosporina C (CsC) : R = OH (2);

Figura 2
Esquema 1

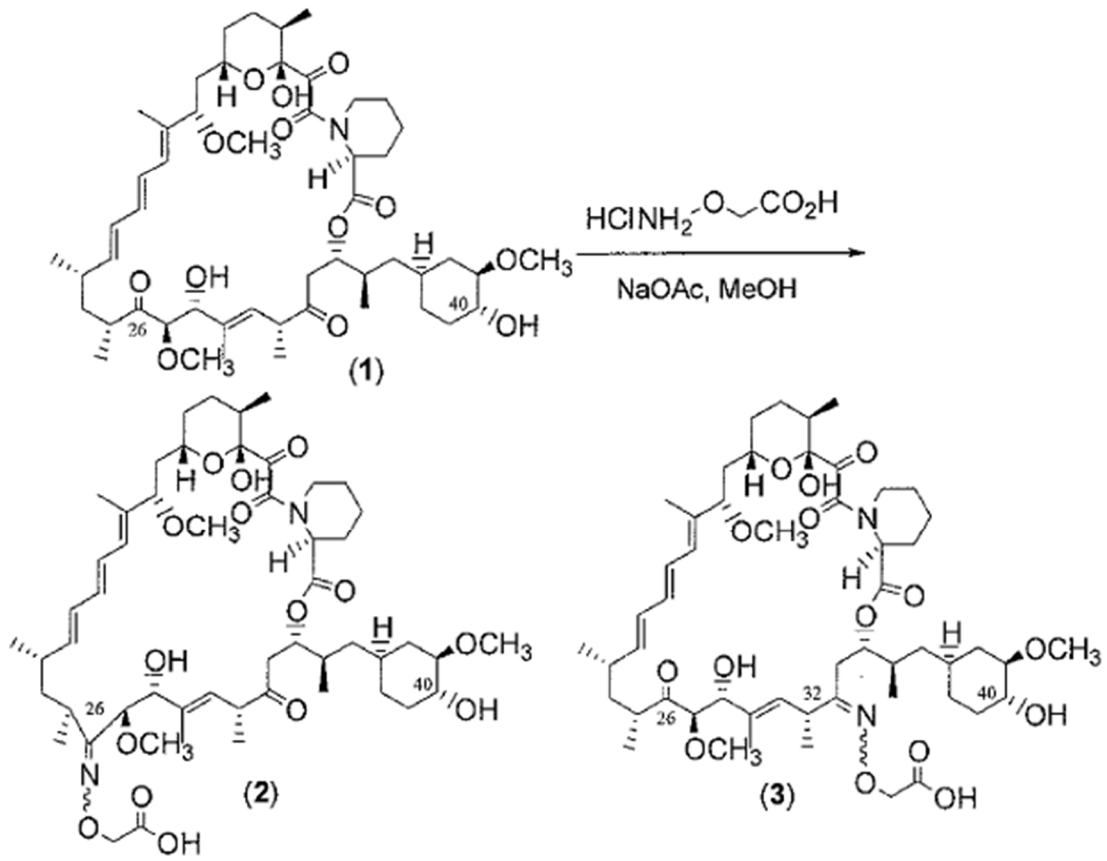


Figura 3
Esquema 2

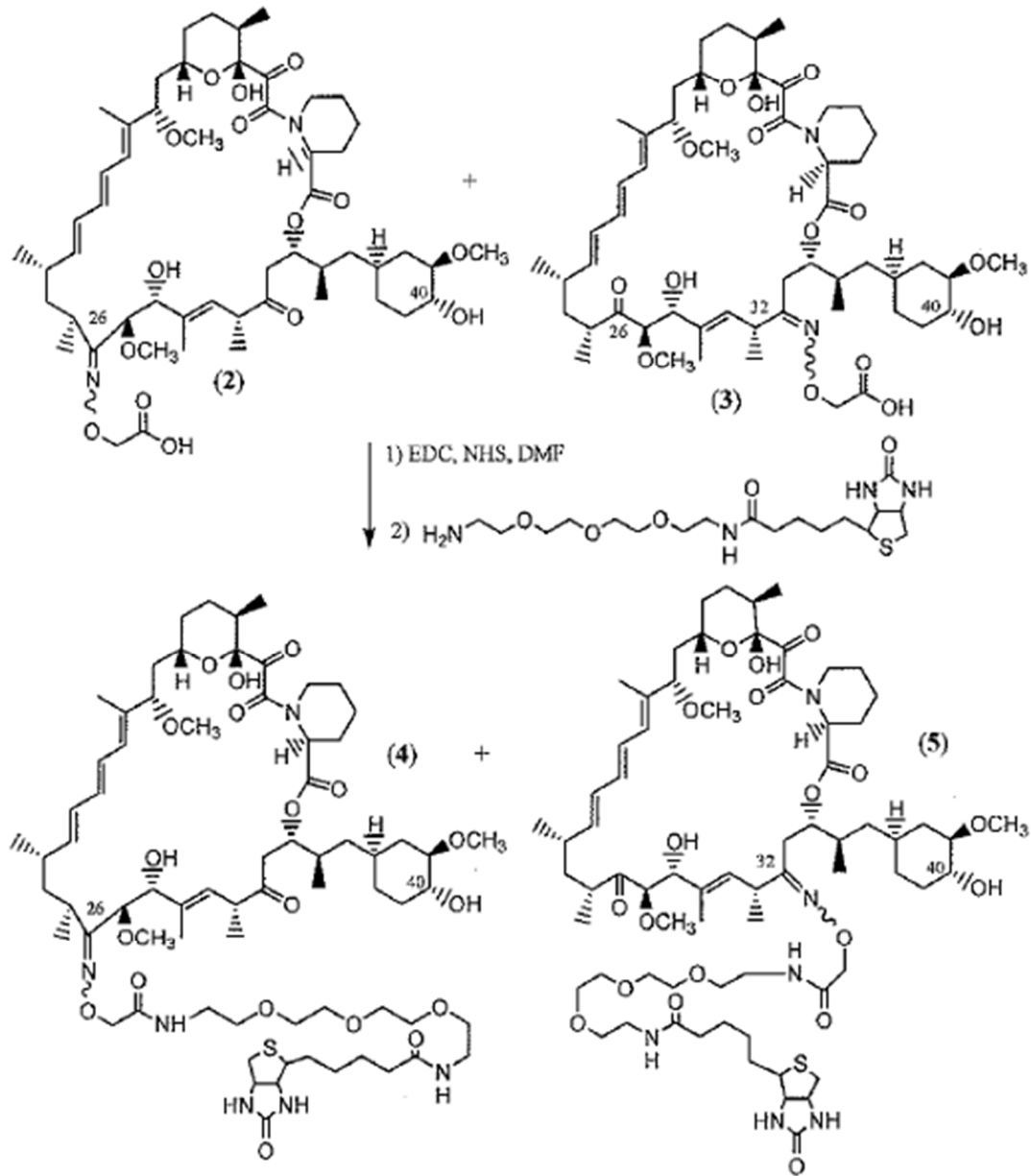


Figura 4
Esquema 3

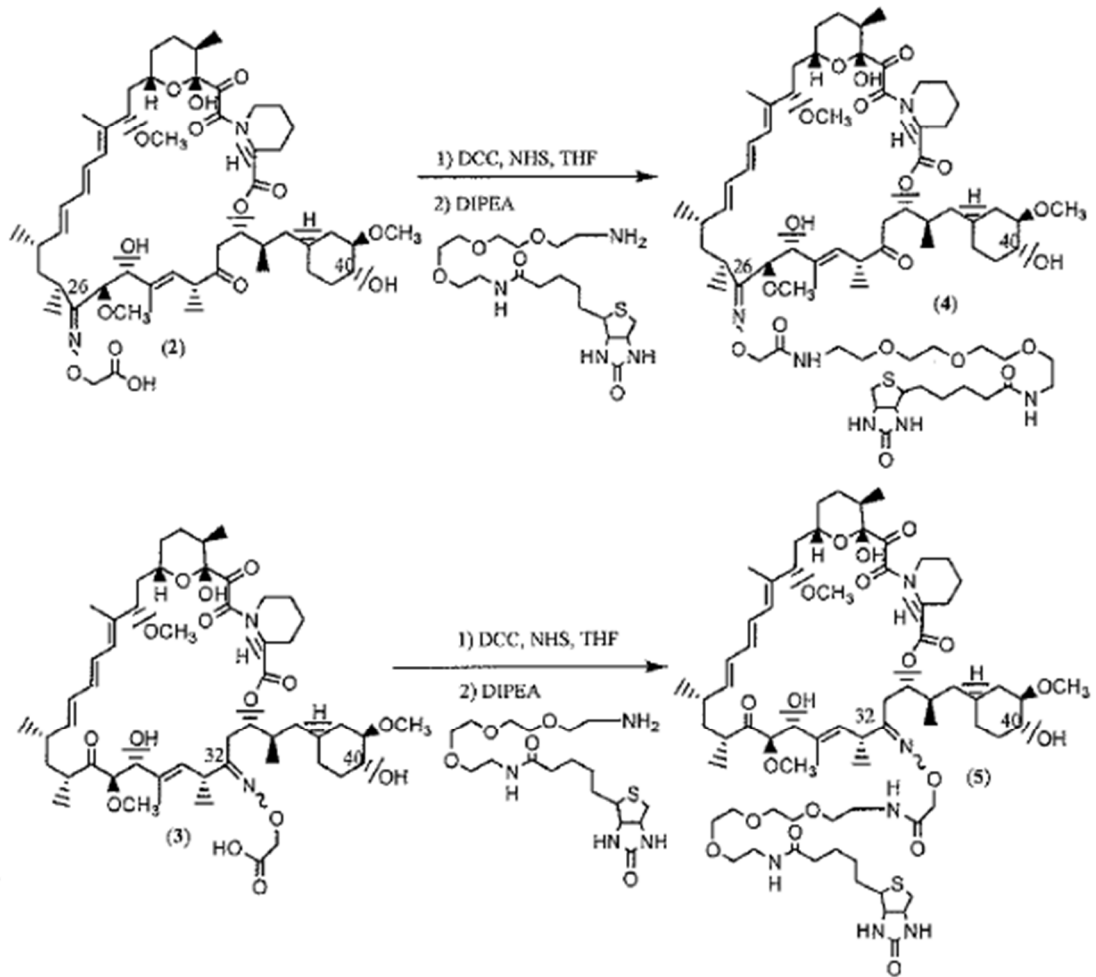


Figura 5

Esquema 4

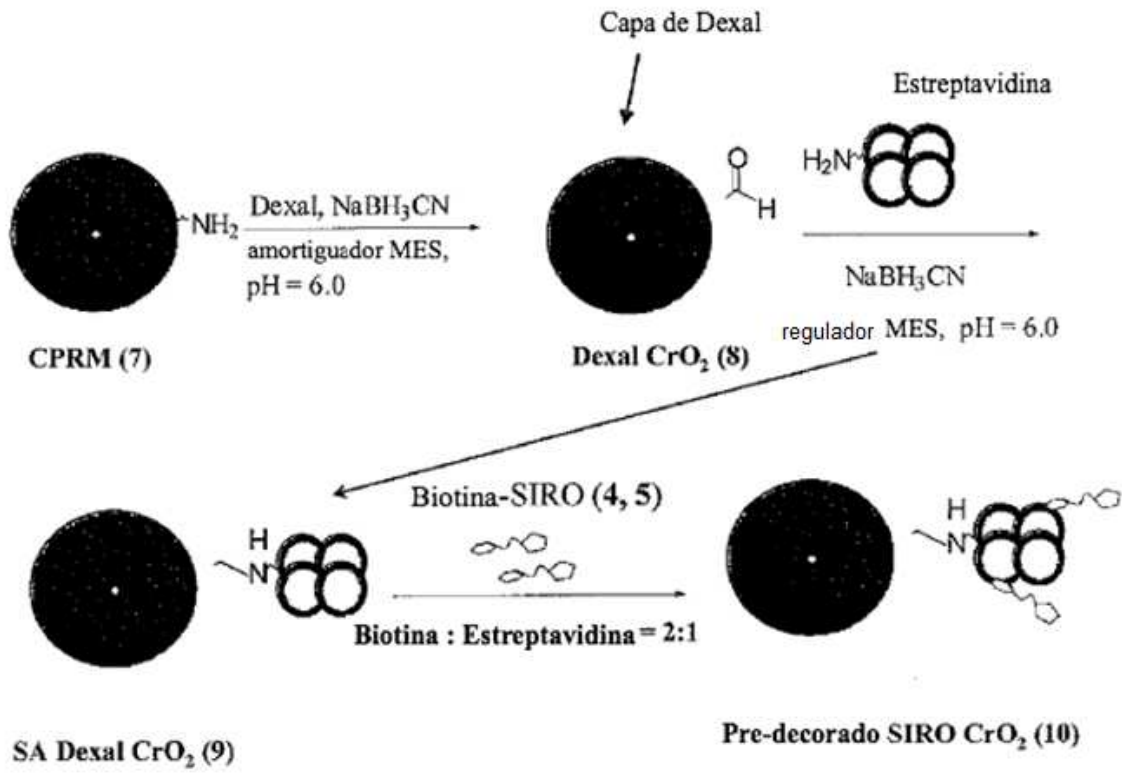


Figura 6

Esquema 5

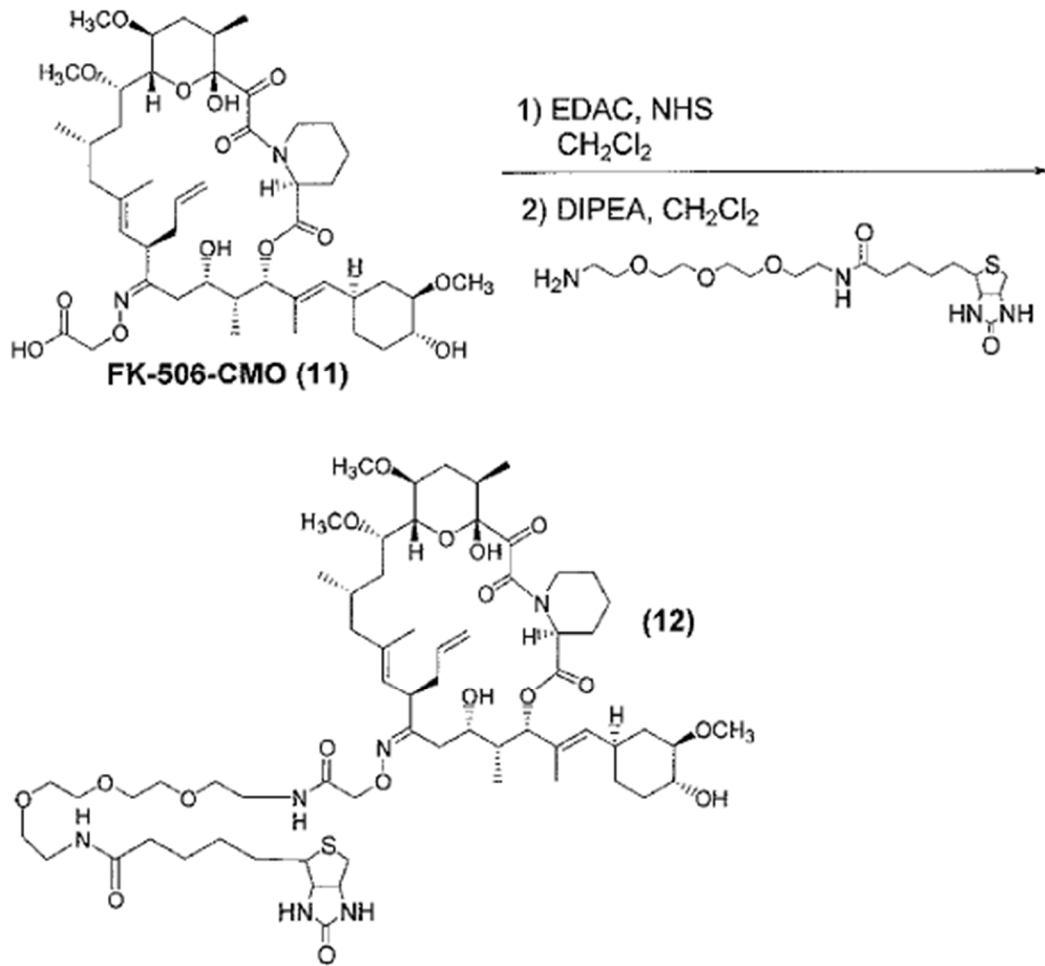


Figura 7A. Estructura de *anti-CsA-m-Ab-LC-Biotina*

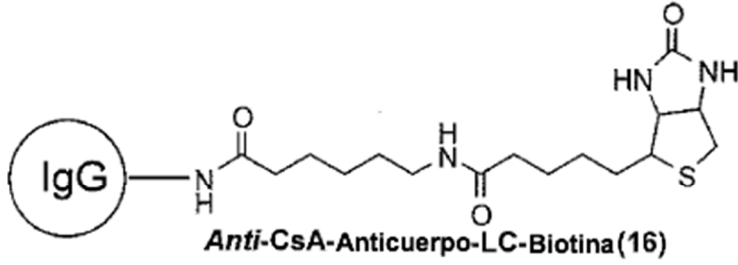


Figura 7B. Estructura de *anti-CsA-m-Ab-PEO₄-Biotina*

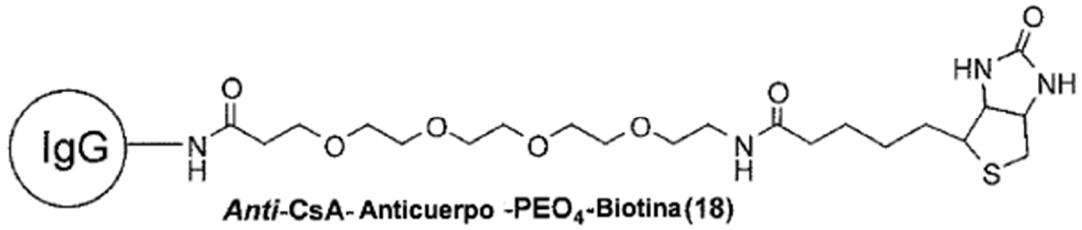


Figura 8

Anti-CsA-Anticuerpo-EPRM Chemibead

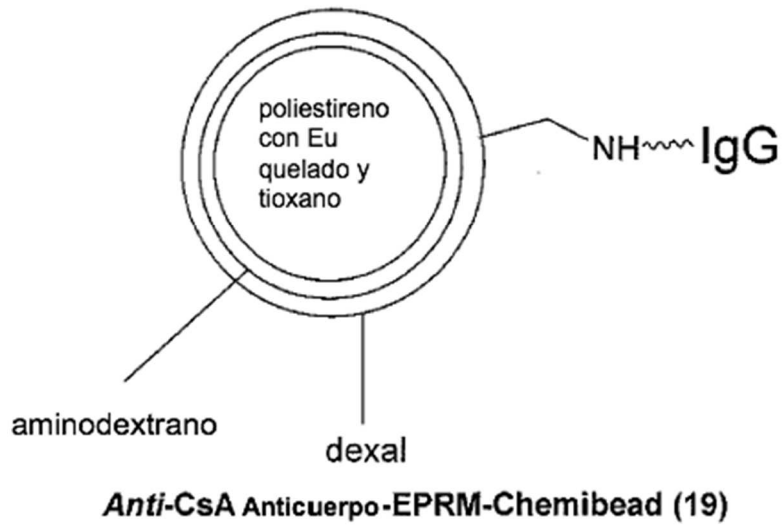
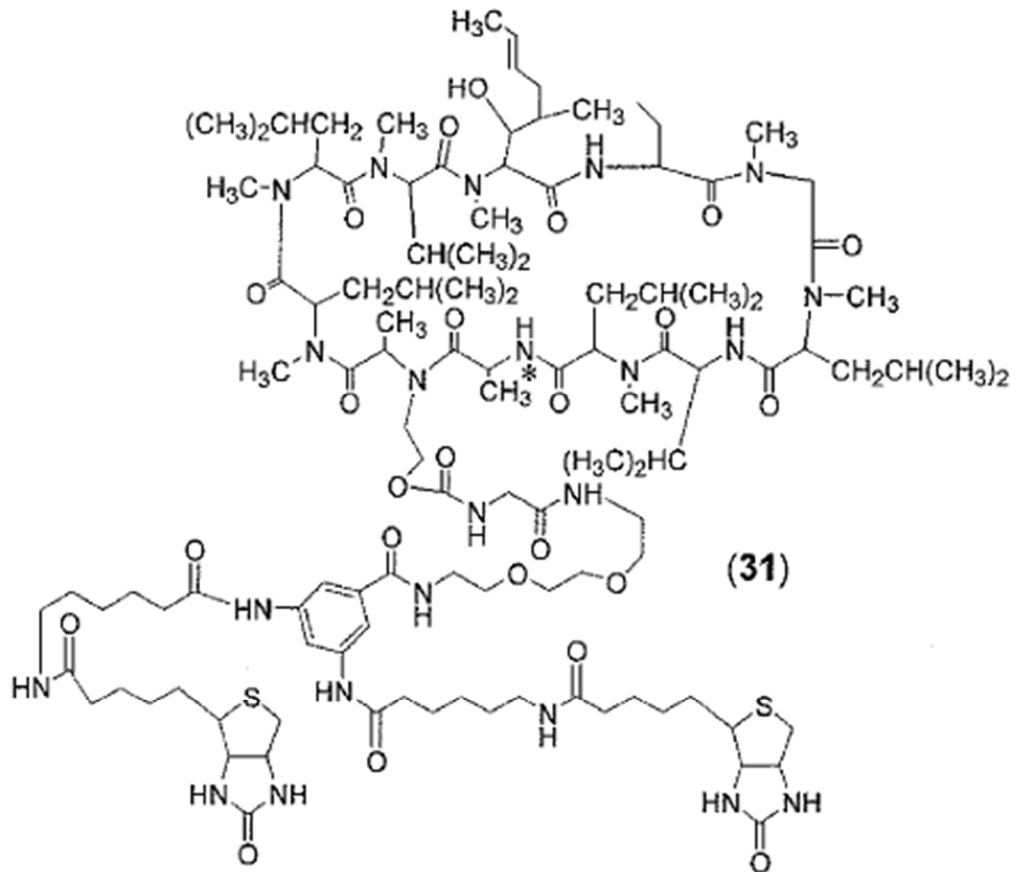


Figura 9

Estructura de CsA-DA-10-Bis-Biotina



* un isómero tiene el mismo enlace enlazador a través de este nitrógeno

Figura 10

Esquema 6. Inmovilización del anticuerpo *anti*-CsA para EPRM.

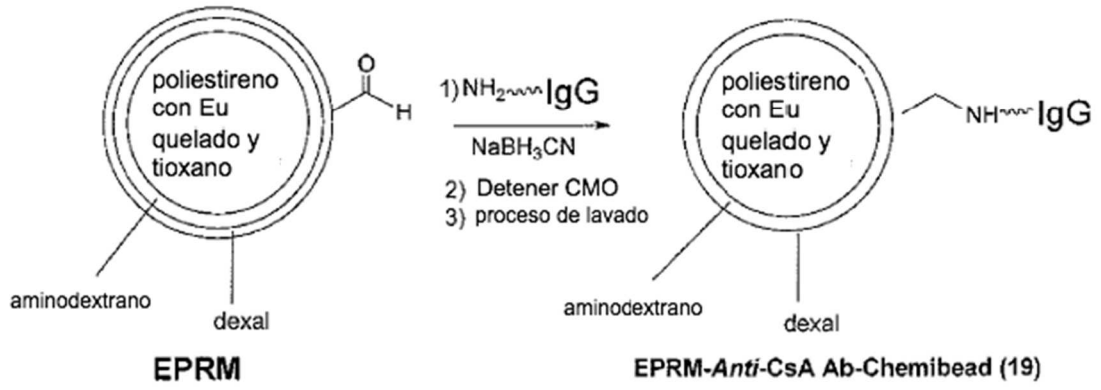


Figura 11

Esquema 7. Síntesis de Bis-Biotina-Enlazador (26)

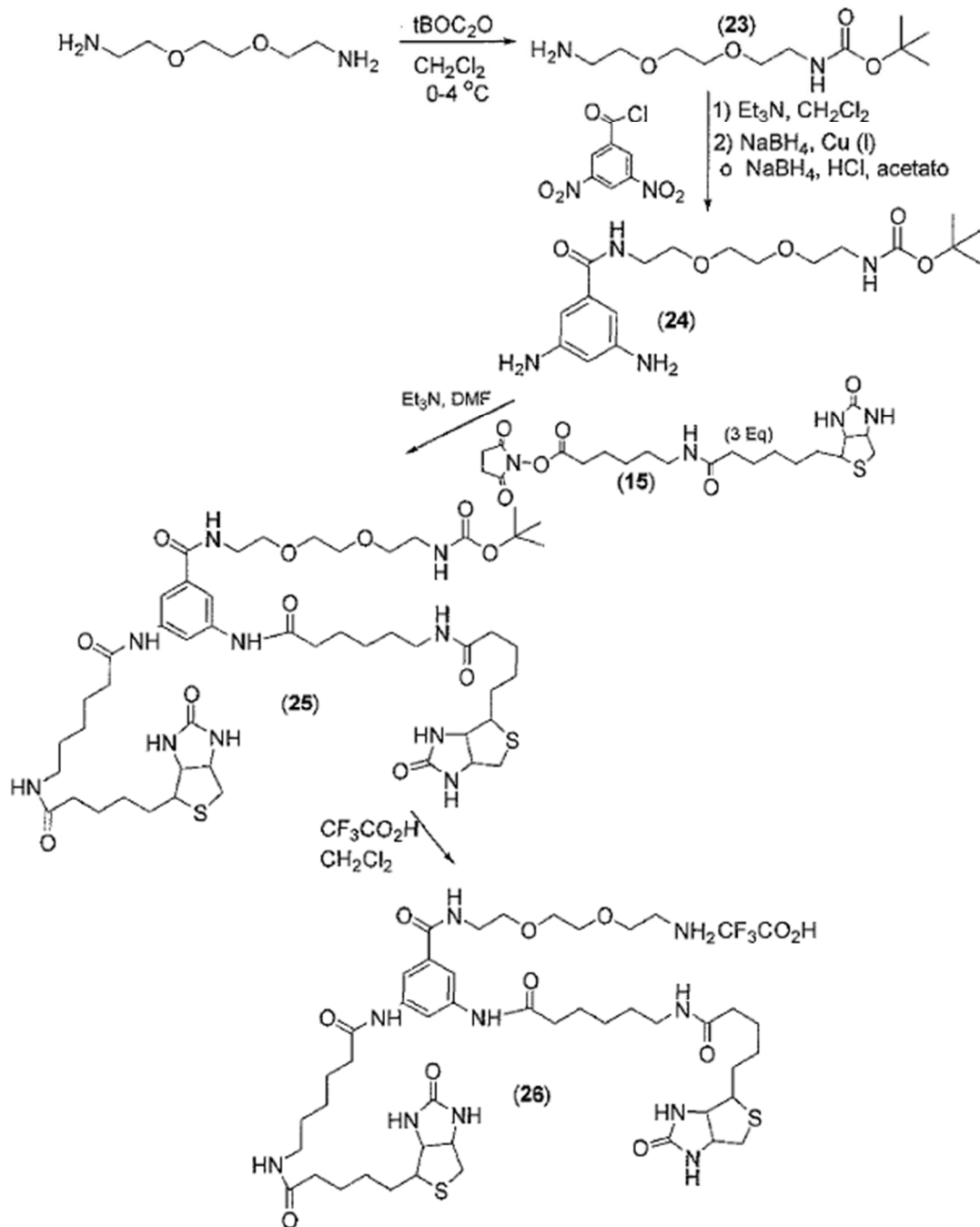
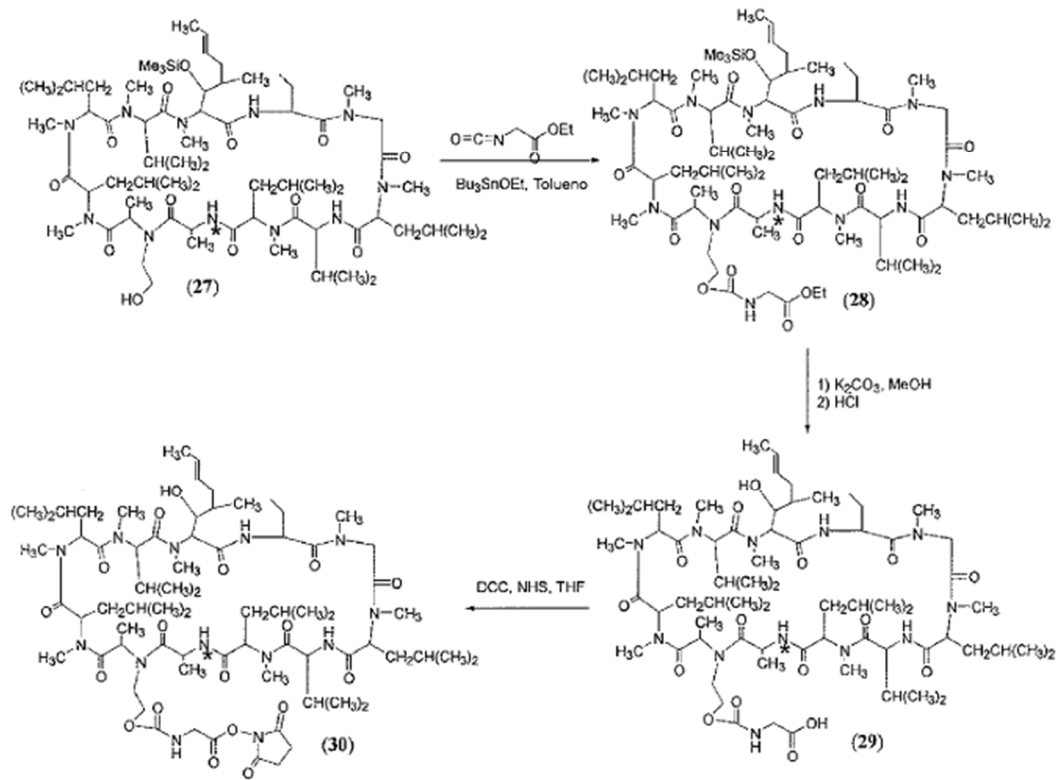


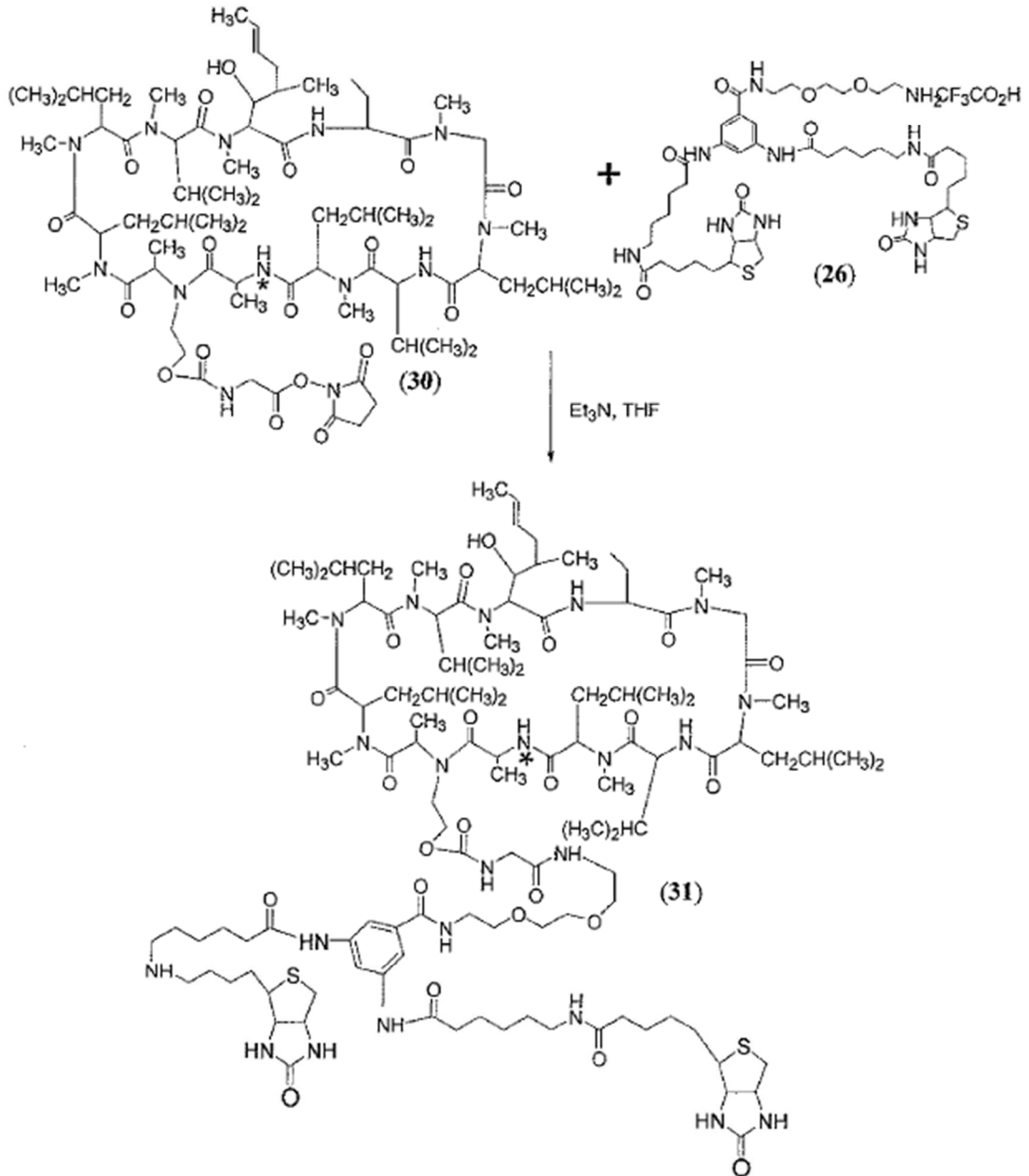
Figura 12

Esquema 8. Síntesis de CsA intermedio (30)



* un isómero tiene el mismo enlace enlazador a través de este nitrógeno

Figura 13
Esquema 9. Síntesis de CsA-bis-Biotina (31)



* un isómero tiene el mismo enlace enlazador a través de este nitrógeno

Figura 14

Dimension® SIRO Curva estándar

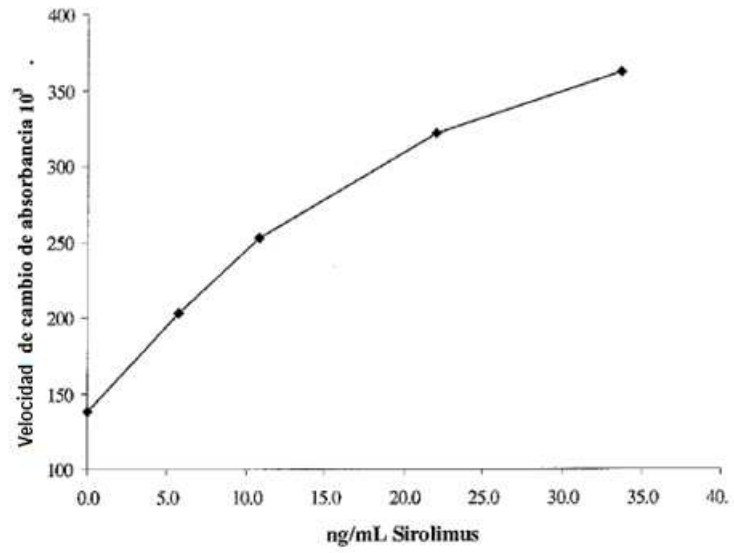


Figura 15

