

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 473**

51 Int. Cl.:

C09K 11/06 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2010 PCT/US2010/053229**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11049968**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2010 E 10825530 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2491093**

54 Título: **Estabilización de la generación de señales en partículas utilizadas en ensayos**

30 Prioridad:

21.10.2009 US 603364

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

22.05.2019

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)**

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

72 Inventor/es:

**CRAIG, ALAN R.;
TENG, ZHU;
SCHELP, CARSTEN;
SNYDER, JASON y
MORAN, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 713 473 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 la generación de señales en partículas utilizadas en ensayos.

Antecedentes

5 Esta invención se refiere a partículas, que son capaces de generar señal, para uso en métodos y composiciones para determinar un analito en una muestra. La invención se refiere además a la estabilización de la señal generada por tales partículas.

10 El campo del diagnóstico clínico ha experimentado una amplia expansión en los últimos años, tanto en cuanto a la variedad de materiales de interés que pueden determinarse con facilidad y precisión, como en los métodos para la determinación. La mayoría de los métodos implican la generación de una señal en relación con la presencia y/o la cantidad de uno o más analitos en una muestra. Los compuestos luminiscentes, tales como los compuestos fluorescentes y los compuestos quimioluminiscentes, tienen una amplia aplicación en el campo del ensayo debido a su capacidad para emitir luz. Las partículas, tales como partículas de látex, liposomas y similares, se han utilizado en ensayos. Las partículas de látex teñidas se han utilizado anteriormente, no solo en inmunoensayos, sino también para otros usos diversos, como la terapia fotodinámica y como pigmentos. Tanto los colorantes absorbentes como los colorantes que imparten propiedades fluorescentes o quimioluminiscentes se han incorporado a las partículas. En un enfoque particular, las partículas que comprenden uno o más quelatos metálicos tales como, por ejemplo, quelatos de lantánido, se emplean para generar una señal.

20 Un inmunoensayo de luminiscencia inducida se describe en la patente de U.S. Nos. 5,340,716 y 6,251,581. 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 de par de unión específico (sbp) que es capaz de unirse a un analito para formar un complejo, o a un segundo miembro de 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 un enfoque particular, las partículas quimioluminiscentes comprenden uno o más quelatos metálicos tales como, por ejemplo, quelatos de lantánido.

30 En una variación del método de luminiscencia inducida, se emplea un soporte particulado que comprende ambos (a) un fotosensibilizador capaz de irradiar la generación de oxígeno singlete y (b) un compuesto quimioluminiscente capaz de ser activado por oxígeno singlete. Los métodos permiten generar una luminiscencia retardada, que se puede realizar tras la irradiación del soporte. Los métodos se aplican a la determinación de un analito en un medio sospechoso de contener el analito. Un método comprende someter un medio sospechoso de contener un analito a las condiciones bajo las cuales se forma un complejo de miembros sbp en relación con la presencia del analito y determinar si el complejo del miembro sbp se ha formado empleando como etiqueta una composición en partículas que tiene tanto propiedades quimioluminiscentes como fotosensibilizadoras. Tras la activación de la propiedad fotosensibilizadora, se genera oxígeno singlete y se activa la propiedad quimioluminiscente. Tales composiciones y métodos se describen en la patente de U.S. No. 5,709,994.

40 Existe una necesidad continua de maximizar la generación de señal en los reactivos de etiquetas para su uso en ensayos. La respuesta de la señal a los cambios en la concentración de analito es una consideración importante en el desarrollo del ensayo. Tales reactivos de etiqueta deben proporcionar un rendimiento máximo, incluida la sensibilidad.

Sumario

45 Una realización de la presente invención es un método para mejorar la estabilidad de un reactivo quimioluminiscente como se define en la reivindicación 1, que comprende un soporte sólido que tiene incorporado en el mismo una composición quimioluminiscente que comprende un complejo de un metal y uno o más agentes quelantes. El reactivo quimioluminiscente está presente en un medio. El método comprende incorporar al medio uno o más agentes estabilizantes, que pueden ser un agente quelante y/o un quelato metálico tal como, por ejemplo, el propio complejo, en una cantidad suficiente para mejorar la estabilidad del reactivo quimioluminiscente del soporte sólido.

50 Otra realización de la presente invención es un reactivo quimioluminiscente para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito como se define en la reivindicación 10. El reactivo quimioluminiscente está presente en un medio. El reactivo quimioluminiscente comprende un soporte sólido que tiene asociado con el mismo un miembro de un par de unión específico y que tiene incorporado en su interior un complejo de un metal y uno o más agentes quelantes. El medio comprende además uno o más agentes estabilizantes, que pueden ser un agente quelante y/o un quelato metálico tal como, por ejemplo, el propio complejo, donde la cantidad de uno o más agentes estabilizantes en el medio es suficiente para mejorar la estabilidad del reactivo quimioluminiscente del soporte sólido.

55 Otra realización de la presente invención es un método para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito como se define en la reivindicación 19. Se proporciona una

combinación en un medio. La combinación comprende (i) la muestra, (ii) el reactivo quimioluminiscente mencionado anteriormente y (iii) un fotosensibilizador asociado con una partícula y capaz de generar oxígeno singlete. Un miembro de par de unión específico para el analito está asociado con al menos uno del soporte sólido o la partícula. La combinación se somete a condiciones para la unión del analito al miembro de par de unión específico para el analito. El fotosensibilizador se irradia con luz y es determinada la cantidad de luminiscencia generada por la composición quimioluminiscente. La cantidad de luminiscencia está relacionada con la cantidad de analito en la muestra.

Descripción detallada de realizaciones específicas

Discusión general

Las realizaciones de los presentes métodos y reactivos se refieren a un soporte sólido tal como, por ejemplo, una partícula. El soporte comprende una composición quimioluminiscente que comprende un quelato metálico. Los presentes inventores observaron que, cuando dicho soporte tal como, por ejemplo, partículas, se empleaban en ensayos para la determinación de un analito, la estabilidad de la salida de señal por la composición quimioluminiscente asociada con la partícula se reducía de manera inaceptable en comparación con las partículas que comprendían otras composiciones quimioluminiscentes. De acuerdo con realizaciones de la presente invención, la estabilidad de la salida de señal de dichas partículas se mejora al incluir en un medio que comprende las partículas una cantidad suficiente de uno o más agentes estabilizantes, que pueden ser un agente quelante y/o un quelato metálico tal como, por ejemplo, el quelato metálico que se asocia con la partícula.

El rendimiento de un formato de ensayo particular en el extremo inferior del rango de decisión médica se puede monitorizar monitorizando la diferencia en la cantidad de señal obtenida para los calibradores que abarcan el rango de concentración de interés sospechoso del analito. Se desea una gran diferencia o separación entre la señal para los calibradores, como por ejemplo el calibrador L1 y el calibrador L2 o el calibrador L2 y el calibrador L3. Por ejemplo, se pueden emplear seis calibradores, denominados arbitrariamente L1-L6. La relación señal/ruido puede evaluarse determinando una cantidad de señal utilizando un calibrador que no contiene analito, calibrador L1 designado arbitrariamente (antecedentes), y la cantidad de señal obtenida para un calibrador que contiene una primera cantidad conocida de analito por encima de cero, designada arbitrariamente calibrador L2. Esta evaluación también puede incluir determinar una cantidad de señal usando el calibrador L1 y la cantidad de señal para un calibrador que contiene una segunda cantidad conocida de analito por encima de cero, designada arbitrariamente como L3. Dicha evaluación también puede incluir dicha determinación utilizando los calibradores L4, L5, L6, y demás. Las realizaciones discutidas en el presente documento proporcionan un mejor rendimiento en un ensayo para un analito en comparación con los reactivos que no están de acuerdo con las presentes realizaciones.

Se desea una gran diferencia entre la señal para los calibradores, por ejemplo, el calibrador L1 y el calibrador L2, o el calibrador L1 y el calibrador L6. Para una buena sensibilidad en el rango de decisión médica, la diferencia en la señal detectada entre el calibrador L1 y el calibrador L2 es al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 100%, al menos aproximadamente 125 %, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 175%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 225%, al menos aproximadamente 250%, al menos aproximadamente 275%, al menos aproximadamente 300%, al menos aproximadamente 325%, al menos aproximadamente el 350%, al menos aproximadamente el 375%, al menos aproximadamente el 400%, al menos aproximadamente el 425%, y demás. En algunas realizaciones, la señal detectada para el calibrador L6 es al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces, mayor que la señal detectada para el calibrador L1. Dependiendo del formato del ensayo, la diferencia en la señal puede ser un aumento en la señal o una disminución en la señal. Típicamente, los resultados de los ensayos que usan los calibradores se presentan en un formato gráfico en el que la cantidad de señal se grafica contra la concentración de los calibradores. De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la pendiente de la línea entre el calibrador L1 y el calibrador L2 generalmente es más pronunciada en comparación con los resultados obtenidos con reactivos de ensayo que no están de acuerdo con las presentes realizaciones. Además, la pendiente de la línea desde el calibrador L1 al calibrador L6 es generalmente más pronunciada en comparación con los resultados obtenidos con reactivos de ensayo que no están de acuerdo con las presentes realizaciones.

Como se mencionó anteriormente, las realizaciones de la presente invención se refieren a mejorar la estabilidad de un reactivo quimioluminiscente, que comprende un soporte sólido que tiene asociado con el mismo una composición quimioluminiscente que comprende un complejo de un metal y uno o más agentes quelantes. El soporte sólido puede estar comprendido de un material insoluble en agua, orgánico o inorgánico, sólido o fluido, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte sólido puede tener cualquiera de un número de formas, tales como formas particuladas, incluyendo perlas y partículas, película, membrana, tubo, pozo, tira, varilla, superficies planas tales como, por ejemplo, placa, y similares. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte sólido puede o no ser suspendible en el medio en el que se emplea. Los ejemplos de un soporte sólido suspendible incluyen materiales poliméricos tales como partículas de látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles, partículas magnéticas y similares. Otras composiciones de soporte sólido 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), poli(vinil butirato), etc.; ya sea por sí mismos o en conjunto con otros materiales.

5 En algunas realizaciones, el soporte sólido es una partícula. Las partículas generalmente tienen un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0,02 micras y no más de aproximadamente 100 micras. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0,05 micras a aproximadamente 20 micras o de aproximadamente 0,3 micras a aproximadamente 10 micras. 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 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 y similares. En algunas realizaciones, las partículas son partículas de cromo o partículas de látex.

10 Una partícula de látex es un material polimérico insoluble en agua, suspendible en agua en partículas. La partícula de látex puede tener dimensiones de partícula de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 20 mm, o aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 nm, de diámetro. En algunas realizaciones, el látex es un polietileno sustituido tal como poliestireno butadieno, poli(acrilamida poliestireno, poliestireno con grupos amino, poli (ácido acrílico), ácido polimetacrílico, acrilonitrilo butadieno, copolímeros de estireno, acetato de polivinil acrilato, acetato-acrilato de polivinilo, polivinil piridina, copolímeros de acrilato de cloruro de vinilo, y similares. En algunas realizaciones se emplean polímeros no entrecruzados de estireno y estireno carboxilado o estireno funcionalizado con otros grupos activos tales como amino, hidroxilo, halo y similares. También se pueden usar copolímeros de estirenos sustituidos con dienos tales como butadieno.

15 Las partículas de polímero pueden formarse a partir de polímeros de adición o condensación. Las partículas serán fácilmente dispersables en un medio acuoso y pueden ser adsorbentes o funcionalizables para permitir la conjugación, directa o indirectamente a través de un grupo de enlace, a un miembro de un sistema productor de señales (sps), un miembro de un par de enlaces específico (sbp), y similares. Las partículas también pueden derivarse de materiales de origen natural, materiales de origen natural que se modifican sintéticamente y materiales sintéticos. Entre los polímeros orgánicos de particular interés están los polisacáridos, particularmente los polisacáridos entrecruzados, como la agarosa, que está disponible como sefarosa, dextrano, disponible como sefadex y sefacrilol, 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.

20 La composición quimioluminiscente comprende un complejo de un metal y uno o más agentes quelantes. Los ejemplos de metales que forman parte del complejo incluyen, por ejemplo, metales de tierras raras, metales en el Grupo VIII y similares. Los metales de las tierras raras comprenden los lantanoides (metales lantánidos) (los 15 elementos desde el lantano hasta el lutecio, números atómicos 57-71). Los metales de tierras raras de particular interés incluyen europio, terbio, disprosio y samario. Los metales del Grupo VIII de interés particular incluyen osmio y rutenio. Los metales de tierras raras generalmente tendrán un estado de oxidación de más tres, el rutenio tendrá un estado de oxidación de más dos y el osmio tendrá un estado de oxidación de más dos. En ciertas realizaciones, el metal se selecciona del grupo que consiste en europio, terbio, disprosio, samario, osmio y rutenio. En algunas realizaciones, el metal es al menos hexacoordinado; sin embargo, el metal puede estar octacoordinado o más coordinado dependiendo del agente quelante del metal.

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

30 Uno de los metales mencionados anteriormente está coordinado con uno o más agentes quelantes seleccionados de 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno (NHA), 4,4'-bis(2",3",3"-heptafluoro-4",6"-hexanodion-6"-il)-o-terfenilo (BHHT), fenantrolina (fen) y compuestos relacionados con fenantrolina (derivados de fenantrolina) tal como, por ejemplo, ácido fenantrolin carboxílico, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (DPP), y similares, 3-(2-tienoilo,1,1,1-trifluoroacetona (TTA), 3-(2-naftoil)-1,1,1-trifluoroacetona (NPPTA), (óxido de trioctil fosfina (TOPO), óxido de trifenilfosfina (TPPO), 3-benzoil-1,1,1-trifluoroacetona (BFTA), 2,2-dimetil-4-perfluorobutiloil-3-butanona (fod), 2,2'-dipiridilo (bpy), ácido salicílico, ácido bipyridilcarboxílico, óxido de trioctilfosfina de aza éteres corona, criptandos aza, y demás como las combinaciones de lo anterior. Como se mencionó anteriormente, en algunas realizaciones, el metal en el quelato metálico es al menos hexacoordinado. El quelato metálico se descargará; por lo tanto, el número de grupos ácidos proporcionados por el agente quelante igualará el estado de oxidación del metal. Normalmente, el agente quelante de metales es relativamente hidrófobo para impartir solubilidad del quelato metálico en disolventes no polares. Los ejemplos de quelatos metálicos particulares, a modo de ilustración y no limitativos, incluyen

Eu(TTA)₃DPP, Eu(NTA)₃DPP, Eu(NHA)₃DPP, Eu(BHHT)₂DPP, quelatos metálicos como se divulga en la patente de U.S. No. 6,916,667 (por ejemplo, columnas 5-9) y la solicitud de patente de U.S. No. 20060270063 (columna 3-4).

Muchos de los agentes quelantes y quelatos metálicos son conocidos en la técnica y muchos están disponibles comercialmente. En general, los quelatos metálicos pueden prepararse a partir de un agente quelante de metales combinando un cloruro de metal con la proporción deseada de moléculas de agente quelante de metales en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, acetonitrilo y suficiente base, por ejemplo, piridina, para absorber ácido clorhídrico que se produce durante la reacción. Por ejemplo, los quelatos metálicos se pueden preparar mediante un procedimiento como el descrito por Shinha, A. P., "Fluorescences and laser action in rare earth chelates", Spectroscopy Inorganic Chemistry, Vol. 2, (1971), 255-288.

La forma de asociación del quelato metálico con el soporte sólido depende de la naturaleza del soporte, la naturaleza del quelato metálico, la naturaleza del disolvente, y demás. La asociación puede ser por adsorción del quelato metálico por el soporte, unión covalente del quelato metálico al soporte, disolución o dispersión del quelato metálico en el soporte sólido, unión no covalente del quelato metálico al soporte por medio de miembros de par de unión (por ejemplo, avidina biotina, digoxina anticuerpo para digoxina, etc.), por ejemplo. De esta manera, el quelato metálico puede estar "asociado con" el soporte sólido.

La asociación del quelato metálico con partículas de látex puede implicar la incorporación durante la formación de las partículas por polimerización, la incorporación en partículas preformadas, usualmente por disolución no covalente en las partículas, y similares. En algunos enfoques se emplea una solución del quelato metálico. Los disolventes que pueden utilizarse incluyen alcoholes, incluyendo etanol, etoxietanol, etilenglicol y alcohol bencílico; amidas tales como dimetilformamida, formamida, acetamida y tetrametilurea y similares; sulfóxidos tales como dimetilsulfóxido y sulfolano; y éteres tales como carbitol, etil carbitol, dimetoxi etano y similares, y agua. El uso de disolventes que tienen altos puntos de ebullición en los cuales las partículas son insolubles permite el uso de temperaturas elevadas para facilitar la disolución de los compuestos en las partículas y son particularmente adecuados. Los disolventes se pueden usar solos o en combinación. Se debe seleccionar un solvente para la reacción que no interfiera con la luminiscencia de los quelatos metálicos debido a sus propiedades intrínsecas o su capacidad para eliminarse de las partículas. En algunas realizaciones, pueden emplearse disolventes aromáticos tales como, por ejemplo, ftalato de dibutilo, benzonitrilo, naftonitrilo, tereftalato de dioctilo, diclorobenceno, difeniléter, dimetoxibenceno y similares.

En general, la temperatura empleada durante el procedimiento se elegirá para maximizar el rendimiento cuántico de las partículas de quelato metálico con la condición de que las partículas no se fundan o se agreguen a la temperatura seleccionada. Normalmente se emplean temperaturas elevadas. Las temperaturas para el procedimiento generalmente oscilarán entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 200°C, o aproximadamente entre 50°C y aproximadamente 170°C. Se ha observado que algunos compuestos que son casi insolubles a temperatura ambiente son solubles, por ejemplo, en alcoholes de bajo peso molecular, tales como etanol y etilenglicol y similares, a temperaturas elevadas. Se ha demostrado que las partículas de látex modificadas carboxiladas toleran los alcoholes de bajo peso molecular a tales temperaturas.

En algunas realizaciones, los reactivos quimioluminiscentes se emplean en ensayos para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito. En tales realizaciones, un asociado de unión para el analito está asociado con el soporte sólido. La forma de asociación del quelato metálico con el soporte sólido depende de la naturaleza del soporte, la naturaleza del asociado de unión para el analito, y demás. La asociación puede ser por adsorción de la pareja de unión por el soporte, unión covalente de la pareja de unión al soporte, unión no covalente de la pareja de unión al soporte por medio de miembros de par de unión (por ejemplo, avidina biotina, digoxina anticuerpo para digoxina, etc.), por ejemplo. De esta manera, la pareja de unión para el analito puede estar "asociada con" el soporte sólido. Los métodos para asociar la pareja de unión para el analito con el soporte sólido son bien conocidos en la técnica y no se repetirán aquí.

En algunas realizaciones, una superficie del soporte sólido comprende uno o más recubrimientos en los que el recubrimiento puede ser, por ejemplo, un polisacárido amino derivado, un polisacárido de carboximetilo, un aldehído de dextrano (dexal). El recubrimiento funcionalizado puede emplearse para reaccionar con una proteína tal como, por ejemplo, un anticuerpo, para formar un producto que se une covalentemente la proteína al soporte sólido. Por ejemplo, se puede utilizar aminodextrano o carboximetildextrano para formar conjugados a miembros de pares de unión específicos. El acoplamiento del dextrano a una proteína, por ejemplo, puede llevarse a cabo a través de la formación de una amida.

En algunas realizaciones, una superficie del soporte sólido no comprende un recubrimiento (es decir, la superficie está libre de un material de recubrimiento tal como los mencionados anteriormente). En estas realizaciones, un compañero de unión para un analito está asociado con el soporte sólido que utiliza una funcionalidad en la superficie del soporte sólido tal como, por ejemplo, un carboxilo, una amina, un hidroxilo, y demás. En una realización particular, pueden emplearse perlas de látex carboxiladas. Algunas de las presentes realizaciones tienen aplicación particular a soportes tales como partículas que tienen asociadas con ellos una composición quimioluminiscente en la que la superficie del soporte está sustancialmente libre de un recubrimiento.

Después de la preparación del reactivo quimioluminiscente, es decir, el soporte sólido que tiene asociado con un quelato metálico, el reactivo quimioluminiscente se coloca en un medio adecuado para su almacenamiento hasta su uso en un ensayo. En muchas realizaciones, el medio es un medio acuoso, normalmente un medio acuoso regulado. El medio acuoso 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, amina, amida y similares. El pH para el medio estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9.5. El pH generalmente se basará en la naturaleza del soporte sólido, la naturaleza del quelato metálico, la naturaleza de los agentes quelantes de metales, y demás. Se pueden usar diversos reguladores para lograr el pH deseado y mantener el pH. Los reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital, TUBOS, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINA y similares. El regulador particular empleado no es crítico, pero con un reactivo quimioluminiscente particular puede preferirse uno u otro regulador. En algunas realizaciones, el medio en el que se almacena el reactivo quimioluminiscente es sustancialmente similar a, o igual al medio para un ensayo para un analito en el que el reactivo quimioluminiscente es uno de los reactivos de ensayo empleados.

El método de acuerdo con realizaciones de la presente invención comprende incorporar en el medio de almacenamiento para el reactivo quimioluminiscente uno o más agentes estabilizantes, que pueden ser un agente quelante y/o un quelato metálico, en una cantidad suficiente para mejorar la estabilidad del reactivo quimioluminiscente en el soporte sólido. En muchas realizaciones, el agente o agentes estabilizantes se seleccionan del mismo agente quelante de agentes que forman parte del quelato metálico asociado con el soporte sólido del reactivo quimioluminiscente o de agentes quelantes que son estructuralmente similares al agente quelante en el quelato metálico. La similitud estructural puede resultar de la disposición espacial de los átomos del agente quelante, de la derivación del agente quelante del quelato metálico tal como, por ejemplo, impartir mayor solubilidad del agente quelante en el medio en el que se almacena el reactivo quimioluminiscente, y demás.

Un grupo o funcionalidad que imparte hidrofiliidad o solubilidad en agua es una funcionalidad hidrofílica, que aumenta la humectabilidad de los sólidos con agua y la solubilidad en agua de los compuestos a los que está ligada. Dicho grupo funcional o funcionalidad puede ser un sustituyente que tenga de 1 a 50 o más átomos y puede incluir un sulfonato, sulfato, fosfato, amidina, fosfonato, carboxilato, hidroxilo, particularmente polioles, amina, éter, amida y similares. Los grupos funcionales ilustrativos son carboxialquilo, sulfonoxialquilo, $\text{CONHOCH}_2\text{COOH}$, CO -(glucosamina), azúcares, dextrano, ciclodextrina, $\text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{COOH}$, SO_3H , $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, PO_3H_2 , OPO_3H_2 , hidroxilo, carboxilo, cetona, y combinaciones de los mismos. Dicho grupo o funcionalidad puede introducirse en el agente quelante por métodos que son bien conocidos en la técnica para introducir tales grupos o funcionalidades en compuestos.

En los casos en los que se emplea un agente quelante estabilizante distinto del agente quelante del reactivo quimioluminiscente, dicho agente estabilizante puede seleccionarse del grupo de agentes quelantes de metales expuestos anteriormente. Como regla general, la capacidad de quelación de un agente estabilizante diferente a la del quelato metálico debe ser al menos tan fuerte como, o más fuerte, que la capacidad de quelación del agente quelante del quelato metálico. En muchas realizaciones en las que el agente estabilizante comprende un quelato metálico, el quelato metálico es el mismo que el quelato metálico asociado con el soporte sólido del reactivo quimioluminiscente. Sin embargo, en algunos casos puede emplearse un agente de quelato metálico estabilizante distinto del quelato metálico del reactivo quimioluminiscente. Dicho quelato metálico para uso como agente estabilizante puede seleccionarse del grupo de quelato metálico expuesto anteriormente.

En una realización específica de lo anterior, a modo de ilustración y no de limitación, el reactivo quimioluminiscente es una partícula de látex que tiene incorporada $\text{Eu}(\text{NHA})_3\text{DPP}$ como el quelato metálico. El agente estabilizante puede ser el agente quelante NHA o DPP o una combinación de ambos NHA y DPP o el agente estabilizante puede ser el propio $\text{Eu}(\text{NHA})_3\text{DPP}$. El agente estabilizante se incorpora al medio en el que se almacena el reactivo quimioluminiscente. Como puede apreciarse, en el ejemplo anterior, el agente quelante empleado como agente estabilizante puede ser cualquiera de los agentes quelantes de metales mencionados anteriormente.

El agente estabilizante se emplea, en el medio en el que se almacena el reactivo quimioluminiscente, en una cantidad suficiente para mejorar la estabilidad del reactivo quimioluminiscente del soporte sólido. La cantidad de agente estabilizante depende de la naturaleza del soporte, la naturaleza del quelato metálico, la naturaleza y las propiedades del agente estabilizante, y demás. El agente estabilizante debe exhibir una solubilidad razonable en el medio en el que se almacena el reactivo quimioluminiscente. En muchos casos, este medio es un medio acuoso y, por lo tanto, el agente estabilizante debe ser soluble en agua o combinaciones de agua y cosolvente en la medida de al menos aproximadamente el 50%, o al menos aproximadamente el 55%, o al menos aproximadamente el 60%, o al menos aproximadamente el 65%, o al menos aproximadamente el 70%, o al menos aproximadamente el 75%, o al menos aproximadamente el 80%, o al menos aproximadamente el 85%, o al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 99%, por ejemplo. La cantidad de agente estabilizante en el medio que es suficiente para estabilizar el reactivo quimioluminiscente y mejorar su salida de señal puede obtenerse empíricamente realizando ensayos con el reactivo quimioluminiscente almacenado en diferentes concentraciones de estabilización y seleccionando la concentración que proporciona el nivel deseado de la salida de señal y resultados en un nivel deseado de estabilidad. En muchas realizaciones, la cantidad de agente estabilizante en el medio es de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 10%, o de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 5%, o de

aproximadamente 0,02% a aproximadamente 2%, o de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 5%, o aproximadamente 0.01 % a aproximadamente 2%, o aproximadamente 0.02% a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0.005% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 0.01% a aproximadamente 3%, o aproximadamente 0.02% a aproximadamente 3%, por ejemplo, en donde el porcentaje es peso a volumen.

- 5 El agente estabilizante empleado puede ser un derivado de un agente quelante de metal del quelato metálico en el que una funcionalidad que mejora la solubilidad en agua del agente quelante se introduce en el agente quelante para impartir mayor solubilidad en un medio acuoso sin interferir en ningún grado sustancial con las propiedades quelantes del agente quelante. Además o como alternativa, la cantidad de cualquier cosolvente, como un solvente orgánico en el medio, puede ajustarse para alcanzar el nivel deseado de solubilidad del agente estabilizante.
- 10 Es interesante observar que el uso del agente estabilizante en el medio en el que se almacena el reactivo quimioluminiscente para mejorar la estabilidad del reactivo es inesperado. La incorporación de un agente estabilizante en el soporte del reactivo quimioluminiscente no proporcionó estabilidad mejorada o salida de señal mejorada.

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

- 15 La presente invención tiene aplicación a cualquier ensayo que utilice un soporte que tenga asociado con el soporte un quelato metálico. Los reactivos de las presentes realizaciones se pueden usar en la mayoría de los ensayos para la determinación de un analito que es un miembro de un sbp. En general, en tales ensayos, los reactivos comprenden, entre otros, un receptor para el analito. Una muestra sospechosa de contener un analito se combina en un medio de ensayo con un receptor para el analito. Se detecta la unión del receptor al analito, si está presente. Un reactivo quimioluminiscente de acuerdo con las realizaciones anteriores se emplea como un reactivo marcador en la detección de este evento de unión en el que el receptor es un socio de unión para el analito de interés. El ensayo puede realizarse sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo.

- 20 Los ensayos heterogéneos generalmente implican 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 Davalian, et al., U.S. Pat. No. 5,089,390 columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9. En un ensayo heterogéneo competitivo típico, un soporte que tiene un anticuerpo para el analito unido al mismo se pone en contacto con un medio que contiene la muestra y el análogo del analito conjugado a un marcador detectable tal como una enzima. El analito en la muestra compite con el análogo del analito 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.

- 25 Un "análogo de analito" es un fármaco modificado que puede competir con el analito análogo por un receptor, la modificación proporciona 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 fármaco 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 demás.

- 30 Un grupo general de inmunoensayos que pueden emplearse incluye inmunoensayos que usan una concentración limitada de anticuerpo. Otro grupo de inmunoensayos implica el uso de un exceso de uno o más de los reactivos principales como, por ejemplo, un exceso de un anticuerpo para el analito. Otro grupo de inmunoensayos son ensayos homogéneos libres de separación en los cuales los reactivos marcados modulan la señal del marcador en las reacciones de unión analito anticuerpo. Otro grupo de ensayos incluye ensayos competitivos limitados con reactivos de anticuerpos marcados para el analito que evitan el uso de haptenos marcados problemáticos. En este tipo de ensayo, el analito inmovilizado en fase sólida está presente en una cantidad constante y limitada. La partición de una etiqueta entre el analito inmovilizado y el analito libre depende de la concentración de analito en la muestra.

- 35 Algunos ensayos utilizan un sistema de producción de señales (sps) que emplea un reactivo quimioluminiscente como un quelato de metal asociado con un soporte y tiene al menos un primer y segundo miembros de sps. La designación "primero" y "segundo" es completamente arbitraria y no pretende sugerir ningún orden o clasificación entre los miembros del sps ni ningún orden de adición de los miembros del sps en los métodos actuales. Los miembros del sps pueden estar relacionados en que la activación de un miembro del sps produce un producto tal como, por ejemplo, la luz, que resulta en la activación de otro miembro del sps. En algunas realizaciones de ensayos conocidos, los miembros sps comprenden un sensibilizador y una composición quimioluminiscente en la que la activación del sensibilizador da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. El segundo miembro de sps generalmente genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de miembro de sps unido y/o no unido, es decir, la cantidad de miembro de sps unido o no unido al analito que se está detectando o a un agente que refleja la cantidad de analito a ser detectado. De acuerdo con realizaciones de la presente invención, la composición quimioluminiscente es el reactivo quimioluminiscente descrito anteriormente en el que el reactivo quimioluminiscente se almacena en un medio que contiene una cantidad estabilizadora de un agente estabilizante.

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 resto 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.

En algunas realizaciones, el sensibilizador es un fotosensibilizador para la generación de oxígeno singlete generalmente por excitación con luz. El fotosensibilizador puede ser fotoactivable (por ejemplo, colorantes y compuestos aromáticos) o activado por quimioterapia (por ejemplo, enzimas y sales metálicas). Cuando se excita con la luz, el fotosensibilizador suele ser un compuesto comprendido de átomos unidos covalentemente, generalmente con múltiples enlaces dobles o triples conjugados. El compuesto debe absorber la luz en el rango de longitud de onda de aproximadamente 200 a aproximadamente 1100 nm, o aproximadamente de 300 a aproximadamente 1000 nm, o aproximadamente de 450 a aproximadamente 950 nm, con un coeficiente de extinción en su máximo de absorbancia mayor que aproximadamente $500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, o al menos aproximadamente $5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, o al menos aproximadamente $50,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en la longitud de onda de excitación. Los fotosensibilizadores que deben ser excitados por la luz serán relativamente estables y no reaccionarán eficientemente con el oxígeno singlete. Varias características estructurales están presentes en la mayoría de los fotosensibilizadores útiles. La mayoría de los fotosensibilizadores tienen al menos uno y con frecuencia tres o más enlaces dobles o triples conjugados que se mantienen en una estructura rígida y frecuentemente aromática. Con frecuencia contendrán al menos un grupo que acelera el cruce entre sistemas, como un grupo carbonilo o imina o un átomo pesado seleccionado de las filas 3-6 de la tabla periódica, especialmente yodo o bromo, o pueden tener estructuras aromáticas extendidas. Los fotosensibilizadores típicos incluyen acetona, benzofenona, 9-tioxantona, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metaloporfirinas, tales como la hematoporfirina, ftalocianinas, clorofilis, rosa de bengala, buckminsterfullereno, etc., y derivados de estos compuestos que tienen sustituyentes de 1 a 50 átomos para hacer que dichos compuestos sean más lipófilos o más hidrófilos y/o como grupos de unión para la unión, por ejemplo, a un miembro sps o un miembro sbp.

Los fotosensibilizadores útiles en los métodos anteriores incluyen otras sustancias y composiciones que pueden producir oxígeno singlete con o, menos preferiblemente, sin activación por una fuente de luz externa. Así, por ejemplo, se ha demostrado que las sales de molibdato y la cloroperoxidasa y la mieloperoxidasa más bromuro o ion cloruro (Kanofsky, J. Biol. Chem. (1983) 259 5596) catalizan la conversión del peróxido de hidrógeno en oxígeno singlete y agua. También se incluyen dentro del alcance de los fotosensibilizadores los compuestos que no son verdaderos sensibilizadores pero que, por excitación por calor, luz o activación química, liberarán una molécula de oxígeno singlete. Los miembros más conocidos de esta clase de compuestos incluyen los endoperóxidos tales como el endoperóxido de 1,4-biscarboxietil-1,4-naftaleno, el 9,10-difenilantraceno-9,10-endoperóxido y el 5,6,11,12-tetrafenilnaftaleno 5,12-endoperóxido. El calentamiento o la absorción directa de la luz por estos compuestos libera oxígeno singlete. Ejemplos de otros fotosensibilizadores que pueden utilizarse son los que se exponen en las patentes U.S. Nos. 5,340,716 y 6,251,581.

La presente invención tiene aplicación en el inmunoensayo de luminiscencia inducida referido en la patente U.S. No. 5,340,716 (Ullman) titulada "Assay Method Utilizing Photoactivated Chemiluminescent Label" ("induced luminescence assay"). 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. De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el compuesto quimioluminiscente es el reactivo quimioluminiscente descrito anteriormente en el que el reactivo quimioluminiscente se almacena en un medio que contiene una cantidad estabilizadora de un agente estabilizante.

En algunas realizaciones del ensayo de luminiscencia inducida, se emplea una partícula, que comprende el compuesto quimioluminiscente asociado con el mismo, tal como por incorporación en el mismo o unión al mismo. Las partículas se conjugan con avidina. Un miembro sbp que se une al analito, es decir, un compañero de unión para el analito, está unido a la biotina. La incubación de los reactivos anteriores produce un reactivo único en el que el miembro sbp está unido a la partícula de una manera irreversible. Luego se puede agregar biotina en una cantidad suficiente para reaccionar con cualquier sitio de unión de avidina no ocupado restante. Un segundo miembro sbp que se une al analito, es decir, un segundo compañero de unión para el analito, es parte de un conjugado de receptor de biotina. La avidina se conjuga con un segundo conjunto de partículas que tienen un fotosensibilizador asociado con ellas. La incubación de estos reactivos da como resultado un reactivo único que tiene el segundo miembro sbp unido a las partículas del fotosensibilizador de manera irreversible. El medio de reacción se incuba para permitir que las partículas se unan al analito en virtud de la unión de los miembros sbp al analito. Luego, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que es capaz en su estado excitado de activar el oxígeno a un estado singlete. Debido a que el compuesto quimioluminiscente de uno de los conjuntos de partículas está ahora cerca del fotosensibilizador en virtud de la presencia del analito, se activa por el oxígeno singlete y emite luminiscencia. Luego se examina el medio para determinar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, y su presencia está relacionada con la presencia del analito. De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el reactivo quimioluminiscente de las presentes

realizaciones en donde el reactivo quimioluminiscente se almacena en un medio que contiene una cantidad estabilizadora de un agente estabilizante se emplea como reactivo de partículas con un compuesto quimioluminiscente asociado con el mismo.

5 La expresión "al menos" como se usa en este documento significa que el número de elementos especificados puede ser igual o mayor que el número citado. La expresión "aproximadamente" como se usa en este documento significa que el número citado puede diferir en más o menos un 10%; por ejemplo, "aproximadamente" de 5" significa un rango de 4.5 a 5.5.

10 La muestra a analizar es una que se sospecha que contiene analito. 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, excremento, fluido cefalorraquídeo, lágrimas, moco y similares; tejido biológico, como cabello, piel, cortes o tejidos extirpados de órganos u otras partes del cuerpo; y demás. En muchos casos, la muestra es sangre total, plasma o suero y, en una realización particular, la muestra es sangre entera.

15 La muestra se puede preparar 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 tal como, por ejemplo, para lisar células sanguíneas y similares. Dicho tratamiento previo se realiza generalmente en un medio que no interfiere posteriormente con un ensayo. Se prefiere un medio acuoso para el tratamiento previo.

20 Como se discutió brevemente más arriba, los ensayos se realizan normalmente en un medio acuoso regulado a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad óptima del ensayo. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir de 0,1 a aproximadamente 40 por ciento en volumen de un cosolvente. 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. El pH generalmente será un compromiso entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específico, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, como los miembros del sistema productor de señal, y demás. Se pueden usar diversos reguladores para lograr el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital, TUBOS, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINA y similares. El regulador particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual se puede preferir uno u otro regulador.

30 Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en los métodos anteriores. Por ejemplo, además de los reguladores, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. Con frecuencia, además de estos aditivos, se pueden incluir proteínas, como las albúminas; disolventes orgánicos tales como formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; potenciadores de la unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; o similar. 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. El medio también puede comprender uno o más conservantes como se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, azida de sodio, sulfato de neomicina, PROCLIN® 300, estreptomycin y similares. Todos los materiales anteriores están presentes en una concentración o cantidad suficiente para lograr el efecto o función deseados.

35 Se pueden aplicar uno o más periodos de incubación al medio en uno o más intervalos, incluidos los intervalos entre las adiciones de diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio generalmente se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos. Las temperaturas moderadas se emplean normalmente para llevar a cabo el método y, generalmente, la temperatura constante, preferiblemente, la temperatura ambiente, durante el período de medición. Las temperaturas de incubación normalmente oscilan entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 99°C, generalmente entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 70°C, más generalmente entre 20°C y 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°C y aproximadamente 50°C, o entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 40°C.

40 La concentración del analito que se puede analizar generalmente varía de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-17} M, más generalmente de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-14} M. Consideraciones, como 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 normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

45 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.

5 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, cada uno de los reactivos, o grupos de reactivos, se pueden combinar secuencialmente. Opcionalmente, un paso de incubación puede estar involucrado después de cada adición como se discutió anteriormente.

Etapa de examen

En una siguiente etapa de los métodos de acuerdo con la presente divulgación, el medio se examina para determinar la presencia de un complejo que comprende el analito y el anticuerpo para el analito. La presencia y/o cantidad del complejo indican la presencia y/o cantidad del analito en la muestra.

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

20 En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio donde la señal producida resulta de la participación del reactivo quimioluminiscente de acuerdo con las presentes realizaciones. La presencia y/o la cantidad de la señal están relacionadas con la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza de los sps. Como se mencionó anteriormente, existen numerosos métodos mediante los cuales una etiqueta de un sps puede producir una señal detectable por medios externos. La activación de un sistema productor de señales depende de la naturaleza de los miembros del sistema que producen señales. Para un miembro de sps que es un sensibilizador que se activa con la luz, el miembro de 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.

30 Cuando se usa un fotosensibilizador, el fotosensibilizador sirve para activar el reactivo quimioluminiscente, en particular, el quelato metálico, cuando se irradia el medio que contiene los reactivos anteriores. El medio se irradia con luz que tiene una longitud de onda de energía suficiente para convertir el fotosensibilizador en un estado excitado y hacer que sea capaz de activar el oxígeno molecular en oxígeno singlete. Cuando se une a un miembro de un sbp, la concentración del fotosensibilizador puede ser muy baja, con frecuencia entre 10^{-6} y 10^{-12} M o menos. Generalmente, para las realizaciones anteriores que implican un fotosensibilizador, el medio se irradia con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 300 a aproximadamente 1200 nm, o aproximadamente 450 a aproximadamente 950, o aproximadamente 550 a aproximadamente 800 nm.

40 El período de irradiación dependerá de la vida útil del reactivo quimioluminiscente activado, la intensidad de la luz y la intensidad de emisión deseada. Para los reactivos quimioluminiscentes activados de vida corta, el período puede ser inferior a un segundo, generalmente de alrededor de un milisegundo, pero puede ser tan corto como un microsegundo en el que se utiliza una lámpara de destello intensa o un láser. Para los reactivos quimioluminiscentes activados de vida más larga, el período de irradiación puede ser más largo y se puede usar una fuente de luz estable menos intensa. En general, la intensidad de la luz integrada durante el período de irradiación debe ser suficiente para excitar al menos el 0.1% de las moléculas fotosensibilizadoras, preferiblemente al menos el 30% y, más preferiblemente, cada molécula fotosensibilizadora se excitará al menos una vez.

50 Un láser de neón con helio es una fuente de luz de bajo coste para la excitación a 632.6 nm. Los fotosensibilizadores que absorben la luz en esta longitud de onda son compatibles con la línea de emisión de un láser de helio-neón y, por lo tanto, son particularmente útiles en los métodos actuales en los que se emplean fotosensibilizadores. Otras fuentes de luz incluyen, por ejemplo, otros láseres tales como Argón, YAG, He/Cd y rubí; fotodiodos; lámparas de vapor de mercurio, sodio y xenón; lámparas incandescentes tales como tungsteno y tungsteno/halógeno; y lámparas de destello.

55 Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían de aproximadamente 10°C a aproximadamente 70°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C. En una aproximación, se forman curvas estándar utilizando concentraciones conocidas de los analitos a cribar. Como se mencionó anteriormente, también se pueden usar calibradores y otros controles.

La luminiscencia o la luz producida en cualquiera de los enfoques anteriores se puede medir visual, fotográficamente, actinométricamente, espectrofotométricamente o por cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad del mismo, que está relacionada con la cantidad de analito en el medio. El examen de la presencia y/o cantidad de la

señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente un paso en el que se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, fluorómetro, espectrómetro de absorción, luminómetro, quimioluminómetro y similares. La presencia y la cantidad de señal detectada están relacionadas con la presencia y la cantidad del analito presente en una muestra.

Kits compuestos por reactivos para la realización de ensayos.

Las presentes composiciones quimioluminiscentes almacenadas en un medio, que comprende un agente estabilizante de acuerdo con las presentes realizaciones, y otros 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 empaquetada un anticuerpo de biotina para el conjugado de analito, partículas sensibilizadoras de estreptavidina y partículas quimioluminiscente análogas al analito, así como cualquier otro reactivo para realizar el ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular. En algunas realizaciones, un kit comprende un anticuerpo para el analito unido a partículas quimioluminiscentes, partículas sensibilizadoras de estreptavidina y un anticuerpo de biotina para el conjugado de analito, así como cualquier otro reactivo para realizar el ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular. Las partículas quimioluminiscentes pueden comprender un quelato metálico como el compuesto quimioluminiscente.

Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o se pueden combinar diversos 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 de un sbp adicionales, reactivos auxiliares, y demás

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. En circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse como un polvo seco, generalmente liofilizado, incluyendo excipientes, que en la disolución proporcionarán una solución de reactivo que tenga las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo de acuerdo con el presente invención. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente.

Los siguientes ejemplos describen además las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación, y pretenden describir y no limitar el alcance de la invención. Las partes y porcentajes descritos en este documento son en peso a volumen a menos que se indique lo contrario.

Ejemplos

A menos que se indique lo contrario, los reactivos fueron de Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Las pruebas se llevaron a cabo utilizando un prototipo del analizador DIMENSION® ExL, disponible en Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE. El instrumento se empleó utilizando tecnología de inmunoensayo de luminiscencia inducida y se equipó con un lector apropiado. Los estudios de estabilidad se realizaron utilizando el ensayo de troponina I cardíaca (cTnI) (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Parte No. RF 623) con los cambios que se establecen a continuación.

Ejemplo 1

Preparación de la solución estabilizadora: 12 mg de 2-(1',1',1',2', 2',3', 3'-heptafluoro-4', 6'-hexanodion-6'-il) -naftaleno (NHA) se disolvió en 1.2 ml de etanol al 99%. Se añadieron una alícuota de 0.2 ml y una alícuota de 1.0 ml de la solución anterior para separar porciones de 1 litro de regulador HEPES diluyente LOCI® a pH 7.2 (Artículo No. 781000.308 de Siemens Healthcare Diagnostics Inc.). Estas dos botellas de solución se agitaron a 4°C durante 3 días y luego se filtraron por separado a través de un filtro de 0.45 micras mientras estaban fríos. La concentración de NHA resultante en cada solución de regulador diluyente LOCI fue de 0.02% y 0.1%, respectivamente. Como resultado, tres diluyentes LOCI diferentes estaban disponibles para llevar a cabo los estudios de estabilidad a continuación. Los tres diluyentes eran diluyentes LOCI que contenían 0 mg/ml (Control), 2 mg/ml (Diluyente 1) y 10 mg/mL (Diluyente 2) de NHA, respectivamente, como agente estabilizante. Estos tres diluyentes se emplearon para preparar los reactivos quimioluminiscentes del ensayo cTnI comercial.

Principios del procedimiento del ensayo cTnI comercial: el método TNI es un inmunoensayo homogéneo de tipo quimioluminiscente en sándwich basado en la tecnología LOCI®. Los reactivos LOCI® incluyen dos reactivos de perlas sintéticas y un fragmento de anticuerpo monoclonal troponina I anticardíaco biotinilado. El primer reactivo de perlas (Sensibeads) está recubierto con estreptavidina y contiene colorante fotosensibilizador. El segundo reactivo de perlas (Chemibeads) está recubierto con un segundo anticuerpo monoclonal antitroponina I anticardíaco y contiene un colorante quimioluminiscente. La muestra se incuba con Chemibeads y anticuerpo biotinilado para formar sándwiches de perlas-troponina I cardíaca-anticuerpos biotinilados. Las Sensibeads se agregan y se unen a la biotina para formar inmunocomplejos de pares de perlas. La iluminación del complejo a 680 nm genera oxígeno singlete de Sensibeads que se difunde en Chemibeads, lo que desencadena una reacción de quimioluminiscencia. La señal resultante se mide a 612 nm y es una función directa de la concentración de troponina I cardíaca en la muestra.

ES 2 713 473 T3

Reactivos. Los reactivos del ensayo fueron los siguientes (Tabla 1) en donde los pozos son pozos del cartucho FLEX® del ensayo cTnI comercial:

Tabla 1

pozos	Forma	Ingrediente	Concentración	Fuente
1-2	Líquido	Anticuerpo biotinilado	8 µg/mL	Ratón monoclonal
3-4	Líquido	Chemibeads de Troponina I	190 µg/mL	Ratón monoclonal
5-6	Líquido	Sensibead de Estreptavidina	1500 µg/mL	<i>E. coli</i> Recombinante
7-8	Líquido	Regulador de ensayo		

5 Estudios de estabilidad. El reactivo Chemibead del kit comercial se preparó en cada uno de los tres diluyentes LOCI mencionados anteriormente, a saber, Control, Diluyente 1 y Diluyente 2. Se estudiaron cinco concentraciones diferentes de analito cTnI en cada diluyente; L1 = 0.01 ng/ml, L2 = 0.59 ng/ml, L3 = 6.2 ng/ml, L4 = 19.8 ng/ml y L5 = 42.15 ng/ml, respectivamente. Las Chemibeads del kit comercial (Chemibead 1) son perlas de poliestireno con europio quelado (quelato = NHA) y tioxeno como la composición quimioluminiscente. Los Chemibeads comprenden una capa de aminodextrano y una capa de aldehído de dextrano exterior con la que se conjuga el anticuerpo anti TnI.

10 Además de lo anterior, se estudió un segundo reactivo de chemibead (Chemibead 2). Las perlas de Chemibead 2 fueron perlas de látex carboxiladas (Seradyn Inc., Indianapolis IN, cat. #100229100440) con europio quelado (quelato = NHA) y tioxeno como la composición quimioluminiscente incorporada en las perlas de látex de una manera tal como se describe en la patente de U.S. 5,811,311. El anticuerpo anti cTnI se acopló a la superficie de las perlas utilizando EDAC/NHS estándar (química de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida. Se preparó Chemibead 1 en cada uno de los tres diluyentes LOCI mencionados. anteriormente, a saber, Control, Diluyente 1 y Diluyente 2. Se estudiaron cinco concentraciones diferentes de analito cTnI en cada diluyente como se discutió anteriormente para Chemibead 1.

15 El estudio de estabilidad se llevó a cabo a dos temperaturas diferentes, a saber, 4°C y 25°C. La generación de la señal utilizando el ensayo cTnI comercial se estudió el día 0, el día 1, el día 5, el día 8 y el día 28. Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con la excepción de que las preparaciones Chemibead 1 y Chemibead 2 fueron sustituidas por las perlas comerciales en diluyente comercial. Los resultados para Chemibead 1 se resumen en la Tabla 2 y los resultados para Chemibead 2 se resumen en la Tabla 3.

Tabla 2

		SEÑAL					
		Control	Control	Chemibead 1	Chemibead 1	Chemibead 1	Chemibead 1
[NHA] mg/L		0	0	2	2	10	10
DÍA	TEMP °C	4	25	4	25	4	25
0	L1	7.4	7.4	7.8	7.8	8.1	8.1
0	L2	31.9	31.9	33.3	33.3	33.6	33.6
0	L3	341.6	341.6	358.8	358.8	359.6	359.6
0	L4	1,402.5	1,402.5	1,464.8	1,464.8	1,464.2	1,464.2
0	L5	3,285.3	3,285.3	3,413.0	3,413.0	3,383.2	3,383.2
1	L1	7.2	6.9	7.7	8.0	8.0	7.7

ES 2 713 473 T3

		SEÑAL					
		Control	Control	Chemibead 1	Chemibead 1	Chemibead 1	Chemibead 1
	[NHA] mg/L	0	0	2	2	10	10
DÍA	TEMP °C	4	25	4	25	4	25
1	L2	32.6	31.5	33.8	33.5	33.1	33.2
1	L3	361.0	343.3	359.1	353.7	364.5	359.0
1	L4	1,470.8	1,436.1	1,492.9	1,463.2	1,533.8	1,475.3
1	L5	3,441.9	3,379.4	3,510.9	3,431.7	3,520.9	3,463.7
5	L1	7.5	6.7	7.8	7.0	7.8	7.1
5	L2	32.6	29.4	33.4	30.0	33.4	30.1
5	L3	351.3	312.0	356.1	319.5	362.3	323.1
5	L4	1,454.3	1,297.5	1,490.2	1,319.6	1,485.6	1,345.0
5	L5	3,394.6	3,017.7	3,504.7	3,109.9	3,469.0	3,151.0
8	L1	7.4		8.2		7.7	
8	L2	32.7		34.0		33.2	
8	L3	353.8		365.7		362.9	
8	L4	1,455.6		1,493.4		1,517.8	
8	L5	3,441.9		3,541.0		3,551.2	
28	L1	7.4	5.6	7.6	6.2	7.7	6.1
28	L2	25.9	19.0	26.7	20.1	26.8	19.9
28	L3	304.8	221.9	324.7	230.3	309.6	230.2
28	L4	1,319.0	954.1	1,380.8	992.8	1,349.9	978.6
28	L5	3,166.2	2,317.2	3,207.9	2,448.5	3,262.0	2,454.9

ES 2 713 473 T3

Tabla 3

	SEÑAL						
		Control	Control	Chemibead 2	Chemibead 2	Chemibead 2	Chemibead 2
	[NHA] mg/L	0	0	2	2	10	10
DÍA	TEMP °C	4	25	4	25	4	25
0	L1	7.5	7.5	8.3	8.3	8.4	8.4
0	L2	30.0	30.0	33.9	33.9	34.2	34.2
0	L3	352.1	352.1	394.4	394.4	390.5	390.5
0	L4	1,414.3	1,414.3	1,570.0	1,570.0	1,549.6	1,549.6
0	L5	3,281.4	3,281.4	3,619.8	3,619.8	3,598.7	3,598.7
1	L1	7.4	6.8	8.4	7.9	8.8	8.3
1	L2	30.6	27.1	34.2	31.7	35.4	33.2
1	L3	360.8	306.9	390.7	358.2	407.0	380.0
1	L4	1,461.9	1,260.8	1,584.8	1,467.2	1,630.1	1,548.2
1	L5	3,382.0	2,962.7	3,660.5	3,366.2	3,761.9	3,630.5
5	L1	7.1	5.7	8.1	6.7	8.6	7.4
5	L2	29.9	19.7	32.7	24.9	34.0	27.0
5	L3	335.0	210.9	372.4	265.3	382.9	317.2
5	L4	1,378.5	873.5	1,517.1	1,080.1	1,563.2	1,260.8
5	L5	3,242.3	2,118.8	3,547.0	2,700.2	3,439.1	2,925.4
8	L1	7.4		8.5		9.1	
8	L2	28.8		34.0		34.9	
8	L3	335.5		385.9		394.4	
8	L4	1,377.8		1,548.9		1,606.8	
8	L5	3,174.2		3,629.2		3,765.2	
28	L1	6.4	3.2	7.9	4.4	9.2	4.8
28	L2	21.8	7.6	28.2	12.1	30.1	12.8

ES 2 713 473 T3

	SEÑAL						
		Control	Control	Chemibead 2	Chemibead 2	Chemibead 2	Chemibead 2
	[NHA] mg/L	0	0	2	2	10	10
DÍA	TEMP °C	4	25	4	25	4	25
28	L3	254.5	76.1	328.0	131.4	326.9	137.9
28	L4	1,083.2	321.0	1,338.1	570.6	1,357.6	580.1
28	L5	2,601.4	821.0	3,156.8	1,462.5	3,253.6	1,461.4

Los resultados anteriores demuestran que el NHA incluido en el diluyente para el reactivo de Chemibead proporcionó una estabilidad significativa durante el almacenamiento de las soluciones de reactivo de Chemibead hasta 28 días a 4°C y 25°C como lo demuestra la generación de señal mejorada sobre el control.

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la estabilidad de la salida de señal mediante un reactivo quimioluminiscente que comprende un soporte sólido que tiene incorporado en el mismo una composición quimioluminiscente que comprende un complejo de un metal y uno o más agentes quelantes, el método comprende incorporar en un medio que comprende el reactivo quimioluminiscente uno o más agentes estabilizantes seleccionados del grupo que consiste en agentes quelantes de metales y quelatos metálicos en una cantidad suficiente para mejorar la estabilidad de la salida de señal mediante el reactivo quimioluminiscente, en donde los agentes quelantes de metales que son agentes estabilizantes se seleccionan del grupo que consiste en 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4', 6'-hexanodion-6'-il)-naftileno, 4,4'-bis (2'',3'',3''-heptafluoro-4'',6''-hexanodion-6''-il)-o--terfenilo, fenantrolina, ácido fenantrolin carboxílico, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (DPP), 3-(2-tienoil, 1,1,1-trifluoroacetona (TTA), 3-(2-naftoil)-1,1,1-trifluoroacetona (NPPTA), (óxido de trioctil fosfina (TOPO), óxido de trifenilfosfina (TPPO). 3-benzoil-1,1,1-trifluoroacetona (BFTA), 2,2-dimetil-4-perfluorobutilo-3-butanona (fod), 2,2'-dipiridilo (bpy), ácido salicílico y ácido bipiridilcarboxílico y en los que los quelatos metálicos que son agentes estabilizantes son quelatos metálicos de 2- (1',1',1',2',2', 3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno, 4,4'-bis (2'',3'',3''-heptafluoro-4'', 6''-hexanodion-6''-il) -o--terfenilo, fenantrolina, ácido fenantrolin carboxílico, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (DPP), 3-(2-tienoil, 1,1,1-trifluoroacetona (TTA), 3-(2-naftoil)-1,1,1-trifluoroacetona (NPPTA), (óxido de trioctilfosfina (TOPO), óxido de trifenilfosfina (TPPO), 3-benzoil-1,1,1-trifluoroacetona (BFTA), 2,2-dimetil-4-perfluorobutilo-3-butanona (fod), 2,2'-dipiridilo (bpy), ácido salicílico y ácido bipiridilcarboxílico.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente estabilizante es un agente quelante de metal del complejo.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el metal es un metal de tierras raras o un metal del Grupo VIII.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el metal se selecciona del grupo que consiste en europio, terbio, disprosio, samario osmio y rutenio.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el metal es europio, el agente quelante es 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno y 4,7-difenil-1,10-fenantrolina y el agente estabilizante comprende 2-(1',1',1',2',2',3',3'- heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno o 2-(1',1',1',2',2',3',3', 3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno y 4,7-difenil-1,10-fenantrolina.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el soporte sólido es una partícula.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el soporte sólido es una partícula de látex.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el complejo se incorpora en el soporte sólido.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que un miembro de un par de unión específico está asociado con el soporte sólido.
10. Un reactivo quimioluminiscente para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito, comprendiendo el reactivo en un medio un soporte sólido que tiene asociado con el mismo un miembro de un par de unión específico y que tiene incorporado en el mismo un complejo de un metal y uno o más agentes quelantes, en donde el medio comprende además uno o más agentes estabilizantes seleccionados del grupo que consiste en agentes quelantes y quelatos metálicos, siendo suficiente la cantidad de uno o más agentes estabilizantes para mejorar la estabilidad de la salida de señal por el reactivo quimioluminiscente en el que los agentes quelantes de metales que son agentes estabilizantes se seleccionan del grupo que consiste en 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno, 4,4'-bis (2'',3'',3''-heptafluoro-4'',6''-hexanodion-6''-il)-o--terfenilo, fenantrolina, ácido fenantrolin carboxílico, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (DPP), 3-(2-tienoilo,1,1,1-trifluoroacetona (TTA) , 3-(2-naftoil)-1,1,1-trifluoroacetona (NPPTA), (óxido de trioctil fosfina (TOPO), óxido de trifenilfosfina (TPPO). 3-benzoil-1,1,1-trifluoroacetona (BFTA), 2,2-dimetil-4-perfluorobutilo-3-butanona (fod), 2,2'-dipiridilo (bpy), ácido salicílico y ácido bipiridilcarboxílico y en los que los quelatos metálicos que son agentes estabilizantes son quelatos metálicos de 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno, 4,4'-bis(2'',3'',3''-heptafluoro-4'',6''-hexanodion-6''-il)-o--terfenilo, fenantrolina, ácido fenantrolin carboxílico, 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (DPP), 3-(2-tienoil, 1,1,1-trifluoroacetona (TTA), 3-(2-naftoil) -1,1,1-trifluoroacetona (NPPTA), (óxido de trioctilfosfina (TOPO), óxido de trifenilfosfina (TPPO), 3-benzoil-1,1,1-trifluoroacetona (BFTA), 2,2-dimetil-4-perfluorobutilo-3-butanona (fod), 2,2'-dipiridilo (bpy), ácido salicílico y ácido bipiridilcarboxílico.
11. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el agente estabilizante es un agente quelante del complejo.
12. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el metal es un metal de tierras raras o un metal del Grupo VIII.

13. El reactivo según la reivindicación 10, en el que el metal se selecciona del grupo que consiste en europio, terbio, disprosio, samario osmio y rutenio.
14. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el soporte sólido es una partícula.
15. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el soporte sólido es una partícula de látex.
- 5 16. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el agente estabilizante es el mismo que el complejo que se incorpora en el soporte sólido.
17. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el soporte sólido comprende además un fotosensibilizador asociado con el mismo.
- 10 18. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el metal es europio, el agente quelante es 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno y 4,7-difenil-1,10-fenantrolina y el agente estabilizante comprende 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno o 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno y 4,7-difenil-1,10-fenantrolina.
19. Un método para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra sospechosa de contener el analito, el método comprende:
- 15 (a) Proporcionar en combinación en un medio:
- (i) la muestra,
- (ii) el reactivo quimioluminiscente de la reivindicación 10, y
- (iii) un fotosensibilizador asociado con una partícula y capaz de generar oxígeno singlete, en el que un miembro de par de unión específico para el analito está asociado con al menos uno del soporte sólido o la partícula,
- 20 (b) someter la combinación a condiciones para la unión del analito al miembro de par de unión específico para el analito, y
- (c) irradiar el fotosensibilizador con luz y detectar la cantidad de luminiscencia generada por el reactivo quimioluminiscente, la cantidad de luminiscencia se relaciona con la cantidad de analito en la muestra.
- 25 20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la partícula con la que está asociado el fotosensibilizador es el soporte sólido del reactivo quimioluminiscente.
21. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el metal es europio, el agente quelante es 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno y 4,7-difenil-1,10-fenantrolina y el agente estabilizante comprende 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno o 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno y 4,7-difenil-1,10-fenantrolina.