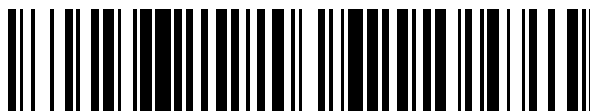


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 736**

51 Int. Cl.:

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2015** **PCT/FR2015/052779**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016** **WO16059351**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2015** **E 15804869 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018** **EP 3207371**

54 Título: **Composición para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia y sus usos**

30 Prioridad:

17.10.2014 FR 1460003

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

04.07.2019

73 Titular/es:

BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy-L'Etoile, FR

72 Inventor/es:

PAOLICCHI, ALDO;
SANESI, ANTONIO;
ROSSI, VERONICA LUCIA;
IENCO, ANDREA y
SUSINI, VANESSA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 718 736 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

Composición para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia y sus usos

5 La presente invención se refiere a una composición para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia, a un kit y a un dispositivo automatizado de inmuno-análisis que contiene tal composición, así como a un procedimiento de detección y/o cuantificación *in vitro* de un analito de interés por inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia asociada.

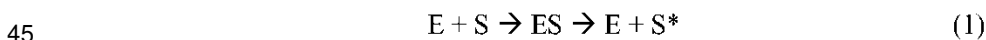
10 Los métodos de detección por ensayo inmunológico se utilizan ampliamente en el campo del diagnóstico. Estos métodos permiten detectar unos analitos en unas muestras de ensayo en forma, en particular, de proteínas (antígenos/anticuerpos), de péptidos y de haptenos, como por ejemplo los esteroides o las vitaminas. El ensayo inmunológico, también denominado procedimiento de inmunoensayo, es un procedimiento ampliamente conocido por el experto en la materia, que implica unas reacciones inmunológicas entre el analito a detectar y uno o más
15 compañeros de unión a este analito.

Los resultados de los ensayos inmunológicos se proporcionan después por un laboratorio a un profesional de sanidad, que los interpretará para, por ejemplo, diagnosticar un estado patológico, o bien la presencia de microorganismos no deseados, y después tomar las medidas necesarias, por ejemplo dar un tratamiento apropiado
20 al paciente o descontaminar un medio industrial que contiene estos microorganismos no deseados. Es por lo tanto particularmente importante que estos ensayos sean al mismo tiempo altamente sensibles, en el sentido que no den resultados falsamente negativos, y altamente específicos, en el sentido que no den resultados falsamente positivos.

Los inmunoensayos enzimáticos o EIA por "enzyme linked immunoassay" constituyen un tipo de ensayo inmunológico ampliamente utilizado en el campo del análisis de muestras susceptibles de contener unos analitos de interés. Estos ensayos se acoplan a una reacción catalizada por una enzima utilizando un sustrato enzimático. Según el sustrato enzimático seleccionado, se puede obtener una señal colorimétrica (ELISA por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Rassasie, M.J., *et al.*, 1992), una señal de fluorescencia (tecnología ELFA por *Enzyme Linked Fluorescent Assay*) o una señal quimioluminiscente (CLIA por *Chemiluminescence Immuno Assays*) (Stabler
25 T.V., *et al.*, 1991).

Estos métodos se basan en unas mediciones que permiten cuantificar las señales emitidas durante el análisis de la muestra de ensayo. La cantidad de señales detectada es generalmente proporcional a la cantidad de analito a medir (por ejemplo durante un ensayo en sándwich) o inversamente proporcional a la cantidad de analito a medir (por
35 ejemplo ensayo de competición), los documentos US3551295, US5854008, Pretti *et al.*, 2012 (Tetrahedron letters, vol. 53, p. 3292-3295) describen unos ensayos de detección de microorganismos que comprenden un compuesto fluorogénico y un compuesto fluorogénico inactivado. Sin embargo, los dos compuestos están presentes de manera separada y se utilizan independientemente.

La tecnología "ELFA" que permite cuantificar unas señales de fluorescencia y obtener unos resultados más sensibles, utilizan una enzima que convierte un sustrato enzimático fluorogénico en un producto de reacción fluorescente, y eventualmente en uno u otros varios productos de reacción, según la ecuación general (1) bien conocida por el experto en la materia:



en la que "E" significa enzima, "S" significa sustrato enzimático fluorogénico, "ES" corresponde al complejo enzima-sustrato y "S*" corresponde a un producto de reacción fluorescente procedente del sustrato enzimático fluorogénico.

50 El producto de reacción S* contenido en el medio de reacción se vuelve fluorescente cuando está excitado por una luz de una longitud de onda particular.

En efecto, en aplicación del principio de fluorescencia, el producto de reacción expuesto o excitado por una fuente luminosa que corresponde a una primera longitud de onda, emitirá a su vez unos rayos luminosos o señales de
55 fluorescencia según una segunda longitud de onda. La primera longitud de onda de excitación varía generalmente en una zona de 250 a 450 nm. La segunda longitud de onda de emisión se sitúa, por su parte, en una zona de emisiones situadas entre 300 y 600 nm.

Así, la detección de las señales de fluorescencia (en unidades relativas de fluorescencia) asociada a un tratamiento de la señal de estas señales de fluorescencia procedentes del medio de reacción, el mismo procedente de la muestra a ensayar y que contiene el producto de reacción, permite determinar, por ejemplo, la presencia o la concentración del analito de interés buscado dentro de la muestra.

Sin embargo, incluso si la tecnología ELFA es más sensible que los ensayos colorimétricos ELISA, el experto en la materia busca todavía unas soluciones que permiten mejorar más la detección de la señal. En efecto, las mediciones fluorométricas se someten a problemas que disminuyen o aumentan de manera no específica la señal de salida.

Así, la detección de la fluorescencia puede variar en función de parámetros tales como el pH, la temperatura, la concentración iónica, el secado, la presencia de interferencias relacionadas con la muestra probada o también la matriz sólida. Estos parámetros influyen en particular sobre la difusión de la luz, sobre el ruido de fondo, lo que afecta a la sensibilidad de un ensayo, especialmente por fluorescencia («Selecting the Detection System - Colorimetric, Fluorescent, Luminescent Methods» (Gibbs *et al.*, Elisa Technical Bulletin – N° 5 de 2001).

Teniendo en cuenta lo anterior, existe en la actualidad una necesidad de encontrar nuevos medios o medios alternativos que permitan aumentar al mismo tiempo la especificidad y la sensibilidad de la tecnología ELFA.

Así, un problema técnico que se propone resolver por la presente invención es hacer más eficaces y más rápidos los inmunoensayos enzimáticos por inmunofluorescencia y, en particular, aumentar la sensibilidad, es decir aumentar la capacidad para dar un resultado positivo cuando se verifica una hipótesis, especialmente cuando el analito está presente en la muestra de prueba a baja cantidad.

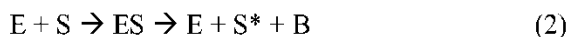
La solución propuesta por la invención a este problema tiene como primer objeto una composición para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia que comprende (i) un sustrato enzimático fluorogénico y (ii) un compuesto fluorogénico inactivado que forma un compuesto fluorescente después de la hidrólisis del sustrato enzimático fluorogénico (i).

Más particularmente, esta composición según la invención comprende o consiste en:

- por un lado un sustrato enzimático fluorogénico que permite, después de la hidrólisis enzimática, la formación de un producto fluorescente y de un segundo producto de reacción que es preferiblemente un anión; y

- por otro lado, un compuesto fluorogénico inactivado que permite, después de la hidrólisis enzimática de dicho sustrato enzimático fluorogénico y gracias al segundo producto de reacción liberado, la formación de un compuesto fluorescente procedente del compuesto fluorogénico inactivado.

En efecto, como se ha indicado anteriormente, puede suceder que, durante una reacción enzimática, la enzima convierta el sustrato enzimático fluorogénico en un producto de reacción fluorescente, pero ocasiona también la formación de un segundo producto de reacción, considerado generalmente como que no presenta ningún interés particular. La ecuación general (2) de tal reacción enzimática puede escribirse de la siguiente manera:



en la que "E" significa enzima, "S" significa sustrato enzimático fluorogénico, "ES" corresponde al complejo enzima-sustrato, "S*" corresponde a un producto de reacción fluorescente y "B" corresponde a un segundo producto de reacción, estando los dos compuestos "S*" y "B" presentes en el medio de reacción.

De manera sorprendente, la solicitante ha podido poner en evidencia que era posible utilizar el segundo producto "B" de la reacción enzimática, no fluorescente, para hacerlo reaccionar con un compuesto fluorogénico inactivado "A". Después de la reacción, el producto "B" reacciona directa o indirectamente sobre el compuesto fluorogénico inactivado "A", lo que permite la generación de un producto fluorescente "A*" o "A*-B".

Por reacción directa del producto "B" sobre el compuesto fluorogénico inactivado "A", se entiende:

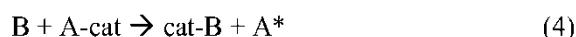
- o bien que el producto "B" reacciona con el compuesto fluorogénico inactivado "A" para liberar un compuesto fluorescente "A*" por un lado y un producto de reacción "B'" por otro lado, según la ecuación (3.1) siguiente:



- o bien que el producto "B" se une específicamente al compuesto fluorogénico inactivado "A" para formar un complejo fluorescente "A*-B" que asocia el compuesto fluorogénico inactivado "A" al producto "B" según la ecuación (3.ii) siguiente:



De manera preferida, el compuesto fluorogénico inactivado comprende una parte que emitirá fluorescencia "A" y un catión liberable "cat", el cual se denomina entonces "A-cat", y la ecuación general de la reacción química directa puede redirigirse de la siguiente manera:



en la que "B" corresponde al segundo producto de reacción detallado en la ecuación general (2) anterior, "A-cat"

significa un compuesto fluorogénico inactivado que comprende una parte que podrá emitir fluorescencia "A*" después de la liberación de su catión "cat", catión "cat" el cual se asociará al producto "B" para formar un producto "cat-B".

Por reacción indirecta del producto "B" sobre el compuesto fluorogénico inactivado, se entiende que el producto "B" se utiliza en un conjunto de reacciones que permiten transformar el compuesto fluorogénico inactivado en compuesto fluorescente, sin unión del producto "B" sobre dicho compuesto fluorogénico inactivado "A". El producto "B" se une entonces sobre otro compuesto presente en el conjunto de las reacciones, el cual se utilizará entonces en una etapa que permite hacer fluorescente el compuesto fluorogénico inactivado.

Así, de manera innovadora, la solicitante utiliza el producto "B" habitualmente considerado como sin interés, procedente de la reacción enzimática detallada en la ecuación (2) anterior, a fin de aumentar la señal fluorescente, haciendo reaccionar, en el medio de reacción, dicho producto de reacción "B" con un compuesto fluorogénico inactivado. Reutilizando los productos de reacción a priori sin interés, la solicitante consigue así aumentar considerablemente la señal fluorescente.

Esta reutilización de los productos de reacción no fluorescentes presenta especialmente las ventajas siguientes:

- esto limita la adición de agentes adicionales cuya síntesis es complicada y difícilmente reproducible, como por ejemplo unos dendrímeros utilizados para amplificar la señal, permitiendo así aumentar la sensibilidad, la preparación de las materias primas y la rapidez de las pruebas;

- el aumento de sensibilidad obtenida se realiza sin cambiar el tiempo de reacción;

- la reacción adicional entre el producto de reacción no fluorescente y el compuesto fluorogénico inactivado, en particular en caso de reacción directa entre el producto de reacción "B" y dicho compuesto fluorogénico inactivado, es simple, rápido y necesita pocas etapas;

- no necesita modificación del instrumento que detecta la señal y por lo tanto es generalmente poco costosa;

- permite detectar unos analitos presentes en baja concentración en la muestra de prueba;

- permite ajustar las concentraciones de compuesto fluorogénico inactivado ("A-cat") para aumentar la fluorescencia de las señales débiles únicamente;

- la detección de la señal de fluorescencia del producto de reacción fluorescente ("S*") y del compuesto fluorogénico inactivado "A" o "A-cat" hecho fluorescente gracias al producto "B" ("A*" o A*-B") se lleva a cabo en gamas de longitudes de ondas situadas en un mismo intervalo.

La invención tiene como segundo objeto un kit para inmunoensayo enzimático por fluorescencia que comprende una composición según la invención.

Tiene como tercer objeto un dispositivo automatizado de inmuno-análisis que comprende una composición según la invención.

Tiene como cuarto objeto la utilización de una composición, de un kit o de un dispositivo automatizado según la invención, para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia.

Tiene como quinto objeto un procedimiento de detección y/o cuantificación *in vitro* de un analito por inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia de tipo sándwich en una muestra líquida de ensayo susceptible de contener dicho analito, que comprende o que consiste en las etapas siguientes de:

- poner en contacto un compañero de captura, previamente fijado o no fijado sobre una superficie sólida, y dicha muestra líquida para la fijación del analito sobre el compañero de captura;

- añadir un compañero de detección, la cual se acopla directa o indirectamente a una enzima capaz de lisar el sustrato enzimático fluorogénico de una composición de la invención, para la fijación sobre el complejo compañero de captura-analito;

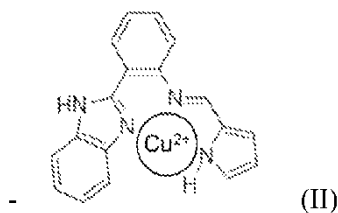
- poner en contacto una composición de la invención y del complejo compañero de captura-analito-compañero de detección para la formación de un medio de reacción; y

- detección por inmunofluorescencia de la presencia y/o de la cantidad de analito midiendo la fluorescencia emitida en el medio de reacción.

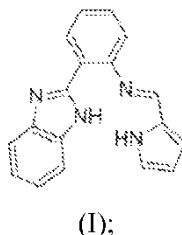
Tiene como sexto objeto un procedimiento de detección y/o cuantificación *in vitro* de un analito por inmunoensayo

enzimático por inmunofluorescencia en una muestra líquida de prueba susceptible de contener dicho analito, que comprende o que consiste en las etapas siguientes de:

- 5 -poner en contacto un compañero de captura, previamente fijado o no fijado sobre una superficie sólida, de un análogo al analito acoplado a una enzima capaz de lisar el sustrato enzimático fluorogénico de una composición de la invención, y de dicha muestra líquida, los cuales entran en competición para la fijación sobre el compañero de captura;
- 10 - poner en contacto una composición de la invención y de los complejos compañero de captura-analito y compañero de captura-análogo al analito para la formación de un medio de reacción; y
- detección por inmunofluorescencia de la presencia y/o cantidad de analito midiendo la fluorescencia emitida en el medio de reacción.
- 15 Finalmente, tiene como último objeto un procedimiento de mejora de la sensibilidad de un procedimiento de detección y/o cuantificación *in vitro* por inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia de un analito de interés en una muestra de prueba, caracterizado por que comprende la utilización, durante la realización del ensayo, de una composición según la invención.
- 20 La invención se entenderá mejor a la lectura de la descripción no limitativa siguiente, redirigida con respecto a los dibujos anexos, en los que:
- la figura 1 esquematiza una reacción conocida de activación de un sustrato enzimático fluorogénico que es el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) en 4-metilumbeliferona (4-MU) y en ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} (Pi por fosfato inorgánico en todas sus formas) por la enzima fosfatasa alcalina (PAL);
- 25 - la figura 2 esquematiza una reacción de activación de un sustrato enzimático fluorogénico que es aquí el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) optimizada por un compuesto fluorogénico inactivado que es un complejo quimiodetector-catión inactivado (A-cat); convirtiéndose el sustrato 4-MUP por la enzima fosfatasa alcalina (PAL) en 4-metilumbeliferona (4-MU) y en ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} (Pi por fosfato inorgánico en todas sus formas), uniéndose dicho ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} resultante específicamente al catión del complejo quimiodetector-catión inactivado A-cat para formar por un lado un producto no fluorescente que asocia el catión al ion fosfato (Pi-cat) y por otro lado un compuesto fluorescente (A*);
- 30 - la figura 3 esquematiza una reacción específica de activación del sustrato enzimático fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) optimizada por el complejo quimiodetector-catión inactivado que asocia azul de calceína e ion cobalto ("CB-Co"); convirtiéndose el sustrato 4-MUP por la enzima fosfatasa alcalina (PAL) en 4-metilumbeliferona (4-MU) y en ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} (Pi por fosfato inorgánico en todas sus formas), uniéndose dicho ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} resultante específicamente al catión del producto quimiodetector-catión inactivado que asocia azul de calceína e ion cobalto ("CB-Co") para formar por un lado un producto no fluorescente que asocia el catión al ion fosfato (Pi-Co) y por otro lado para liberar el compuesto fluorescente azul de calceína (CB*) del medio;
- 35 - la figura 4 ilustra que el compuesto fluorogénico inactivado, que es el complejo quimiodetector-catión inactivado que asocia azul de calceína e ion cobalto ("CB-Co"), está activado por unas concentraciones crecientes de fosfato inorgánico Pi y permite formar el compuesto fluorescente azul de calceína (CB*) en función de dicha concentración en fosfato inorgánico Pi [longitud de onda λ en nm / intensidad de emisión en unidades arbitrarias (a.u.)];
- 40 - la figura 5 ilustra que el espectro de emisión medido con la ayuda de un espectrofluorímetro para las dos soluciones siguientes es sustancialmente similar:
- 45 * una solución a pH 9,4 que comprende 6410 nM de azul de calceína, 0,6 mM de dietanolamina (DEA); 0,3 mM de ácido etileno diamina tetraacético (EDTA) y 0,5 mM de MgCl_2 ; y
- * una solución VIDAS® OPT que comprende 6410 nM de sustrato enzimático fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) [longitud de onda λ en nm / intensidad de emisión en unidades arbitrarias (a.u.)]
- 50 - la figura 6 ilustra el hecho de que la fluorescencia del azul de calceína está apagada después de la adición de un ion Cobalto (Co^{2+}). [(longitud de onda λ en nm / intensidad de emisión en unidades arbitrarias (a.u.)).]
- 55 - la figura 7 esquematiza una reacción específica de activación del sustrato enzimático fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) optimizada por el complejo quimiodetector-catión inactivado de fórmula (II) que asocia un derivado de bencimidazol al ion cobre (Cu^{2+}):
- 60



convirtiéndose el sustrato 4-MUP por la enzima fosfatasa alcalina (PAL) en 4-metilumbeliferona (4-MU) y en ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} (Pi por fosfato inorgánico en todas sus formas), asociándose dicho ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} resultante al catión Cu^{2+} del complejo quimiodetector-catión inactivado que asocia un derivado de bencimidazol al ion cobre (Cu^{2+}), para formar por un lado un producto no fluorescente que asocia el catión Cu^{2+} al ion fosfato (Pi-Cu) y por otro lado para liberar el derivado de bencimidazol fluorescente N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)metiliden]amina de fórmula (I) siguiente:



- la figura 8 esquematiza las diferentes etapas de una prueba detallada en el ejemplo 3, que permite especialmente determinar la fluorescencia adicional generada por un compuesto fluorescente según la invención;

- la figura 9 esquematiza el principio del ensayo PiPer™ [PiPer™ Fosfato Assay kit (Invitrogen™)] en el que, en presencia de fosfato inorgánico, la maltosa fosforilasa convierte la maltosa en glucosa y glucosa-1-fosfato. Después, la glucosa oxidasa convierte la glucosa en gluconolactona y H_2O_2 . Finalmente, con la peroxidasa de rábano picante (HRP), el H_2O_2 reacciona con el reactivo no fluorescente Amplex Red para generar la molécula Resorufina altamente fluorescente;

- la figura 10 compara la fluorescencia media entre por un lado una composición para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia que comprende únicamente un sustrato enzimático fluorogénico que es el 4-MUP, y por otro lado una composición para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia según la invención, que comprende al mismo tiempo un sustrato enzimático fluorogénico que es el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) y un complejo quimiodetector-catión inactivado que asocia azul de calceína e ion cobalto ("CB-Co"); y

- la figura 11 muestra que el complejo quimiodetector-catión inactivado que asocia la N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)metiliden]-amina al ion cobre (Cu^{2+}) no emite efectivamente fluorescencia, y que la fluorescencia se obtiene después de la introducción de fosfato inorgánico Pi en el medio [longitud de onda λ en nm / intensidad de emisión en unidades arbitrarias (a.u.)].

La invención se refiere por lo tanto a una composición para inmunoensayo enzimático por inmuno-fluorescencia que comprende (i) un sustrato enzimático fluorogénico así como (ii) un compuesto fluorogénico inactivado que forma un compuesto fluorescente después de la hidrólisis enzimática del sustrato (i).

Más particularmente, esta composición según la invención comprende:

- por un lado (i) un sustrato enzimático fluorogénico que permite, después de la hidrólisis enzimática, la formación de un producto fluorescente (denominado primer producto fluorescente) y de un segundo producto de reacción que es preferiblemente un anión; y

- por otro lado (ii) un compuesto fluorogénico inactivado que permite la formación de un compuesto fluorescente (denominado segundo producto fluorescente) gracias, especialmente, a la liberación del segundo producto de reacción que es preferiblemente un anión procedente de la hidrólisis enzimática del sustrato (i).

Los sustratos enzimáticos fluorogénicos útiles a los fines de la invención, que se pueden denominar sustratos primarios en el ámbito de la invención, son todos unos sustratos conocidos por el experto en la materia que dan, después de la hidrólisis enzimática, un producto fluorescente y un segundo producto de reacción que es preferiblemente un anión.

Según un modo particular de realización de la invención, el sustrato enzimático fluorogénico primario se selecciona entre el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP), el 4-metilumbeliferil galactósido (4-MUG), el 4-metilumbeliferil sulfato (4-

MUS), la fluoresceína di-fosfato (FDP), el 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato (DiFMUP), el 9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetillacridin-2-ona-7-il)fosfato (DDAO fosfato), el 2'-[2-benzotiazol]-6'-hidroxibenzotiazol fosfato, el 2-naftil fosfato y el 2-umbeliferil fosfato.

- 5 En este modo de realización particular, el primer producto fluorescente formado "S*" es la 4-metilumbeliferona (4-MU), y el segundo producto de reacción "B" es un anión o un azúcar.

Preferentemente, el sustrato enzimático fluorogénico primario se selecciona entre el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP), el 4-metilumbeliferil sulfato (4-MUS) y el 4-metilumbeliferil galactósido (4-MUG). Así, preferentemente, el
10 segundo producto de reacción es un anión seleccionado entre el ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} (o fosfato inorgánico anotado Pi) y el ion sulfato SO_4^{2-} , o es un azúcar que es el galactósido.

Más preferentemente, el sustrato enzimático fluorogénico primario se selecciona entre el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) y el 4-metilumbeliferil sulfato (4-MUS). Así, preferentemente, el segundo producto de reacción es un ion
15 hidrogenofosfato HPO_4^{2-} (o fosfato inorgánico anotado Pi) o un ion sulfato SO_4^{2-} .

Más preferiblemente aún, el sustrato enzimático fluorogénico primario es el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) y el segundo producto de reacción es el anión hidrogenofosfato HPO_4^{2-} .

20 También se conocen por el experto en la materia las enzimas que permiten la formación de tal primer producto fluorescente y de un segundo producto de reacción. Entre las enzimas disponibles para unos inmunoensayos enzimáticos por inmunofluorescencia, se puede citar en particular la sulfatasa, la fosfatasa alcalina (PAL), la fosfatasa ácida, la glucosa oxidasa (GOx), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y la β -galactosidasa (β -gal).

25 Preferiblemente, las enzimas que permiten la formación de un producto fluorescente y de un segundo producto de reacción que es un anión se seleccionan entre la sulfatasa, la fosfatasa ácida y la fosfatasa alcalina (PAL).

Según un modo de realización particular, el sustrato enzimático fluorogénico primario es el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) que permite la formación de la 4-metilumbeliferona (4-MU) y del ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} en presencia
30 de la enzima PAL.

El primer producto fluorescente procedente de la reacción enzimático se excita preferiblemente a una longitud de onda comprendida entre 250 y 450 nm y emite a una longitud de onda comprendida entre 300 y 600 nm.

35 Ventajosamente, el primer producto fluorescente se excita a una longitud de onda comprendida entre 300 y 400 nm y emite a una longitud de onda comprendida entre 400 y 500 nm.

Más ventajosamente aún, el primer producto fluorescente se excita a una longitud de onda comprendida entre 350 y 380 nm y emite a una longitud de onda comprendida entre 420 y 480 nm.

40 Por "compuesto fluorogénico inactivado", que se puede denominar sustrato secundario en el ámbito de la invención, se entiende un compuesto que contiene un grupo que, cuando comprende este grupo fijado, no es capaz de emitir fluorescencia ("*fluorescencia quenching*" en inglés), pero que emite una señal fluorescente cuando el grupo se separa del compuesto. Se puede hablar de grupo "extintor" o "de extinción".

45 Como ejemplos de tales compuestos fluorogénicos inactivados, se pueden citar unos derivados de compuestos fluorescentes clásicos para el experto en la materia, tales como unos derivados de cumarinas o resorufinas, los cuales contienen unos grupos que impiden la emisión de fluorescencia. A título de ejemplos de tales grupos, se pueden citar el grupo $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_3$ que, si está fijado a la resorufina, apaga la fluorescencia de la resorufina. Un derivado de resorufina que comprende tal grupo es el reactivo Amplex® Red cuyo dispositivo automatizado de pérdida del grupo para producir resorufina fluorescente en presencia de fosfato inorgánico (reacción indirecta) se describe en la noticia de PiPer™ Fosfato Assay kit (Invitrogen™) y está esquematizado en la figura 9. De manera general, la pérdida del grupo "extintor" se realiza gracias a la acción de una enzima, siendo esta enzima la peroxidasa de rábano picante en el ejemplo anterior. De manera general, estos derivados de compuestos
50 fluorescentes pueden ser unos sustratos enzimáticos fluorogénicos, diferentes del sustrato enzimático fluorogénico primario, con la condición de que formen un compuesto fluorescente (se dice que están activados) en presencia del segundo producto de reacción liberado por hidrólisis enzimática del sustrato primario.

Otros ejemplos de compuestos fluorescentes inactivados útiles para los fines de la invención comprenden los
60 quimiodetectores selectivos asociados a un catión, los cuales están inactivados en esta forma asociada. Se denominan complejos quimiodetector-catión inactivados. Como se ilustra en la figura 2, este sustrato secundario de tipo quimiodetector selectivo asociado a un catión "A-cat" es apto para activarse después directamente por el segundo producto de reacción generado después de la hidrólisis enzimática del sustrato enzimático fluorogénico, en el caso de la figura 2 el anión "Pi", lo que permitirá generar directamente una señal adicional.

65 La utilización de estos últimos compuestos a título de compuestos fluorogénicos inactivados tiene como ventaja que

el producto de reacción "B" o "Pi" en la figura 2, reacciona con el catión del complejo quimiodetector-catión inactivado y permite:

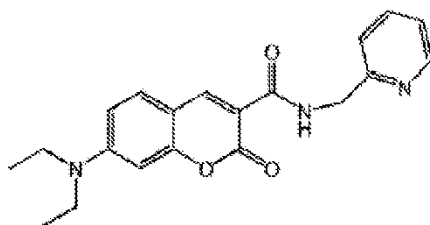
- la formación de un complejo que asocia el producto de reacción al catión ("Pi-cat" en la figura 2) por un lado, y

- la formación del compuesto fluorescente ("A*") que permite producir una segunda señal fluorescente. La segunda señal fluorescente no necesita la adición de compuestos suplementarios para realizar el conjunto de reacciones necesarias para la formación del compuesto en forma fluorescente, como en el caso de los derivados de compuestos fluorescentes clásicos, lo que constituye un modo de realización particular de la invención.

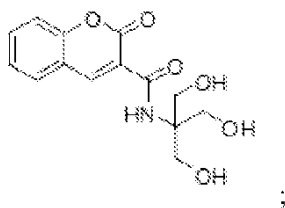
A título de ejemplo no limitativo de quimiodetector utilizable, se pueden citar los compuestos fluorescentes siguientes:

(i) las cumarinas hidrófilas, como se describen por Jung H.S. *et al.*, 2009, Thomas F. y Serratrice G., 1999, y Yao J. *et al.*, 2009, tales como

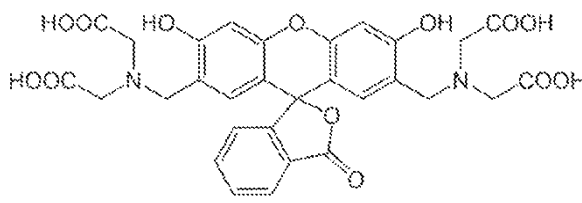
- la 7-(dietilamino)-2-oxo-N-((piridin-2-il)-metil)-2H-cromeno-3-carboxamida:



- la N-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida:

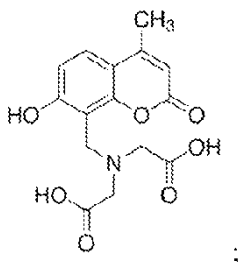


- la calceína:



y

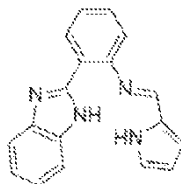
- el azul de calceína:



(ii) el poli(9-aminofluoreno), como se describe en Zhang G. *et al.*, 2012;

(iii) los derivados de bencimidazol, como se describen por Alvaro M. *et al.*, 2001, Henary M.M. *et al.*, 2004 y Saluja P. *et al.*, 2012, tales como:

- la N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)-metiliden]amina de fórmula (I) siguiente:

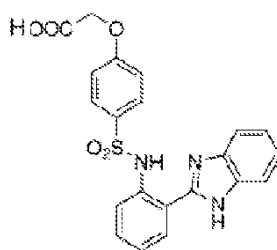


(I) ;

5

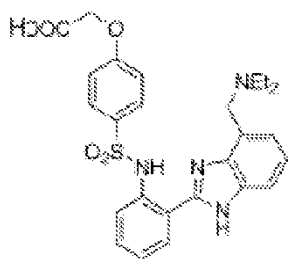
- el macrociclo N, S de derivado del bis-bencimidazol;

- el ácido {4-[2-(1H-bencimidazol-2-il)fenil-sulfamoil]-fenoxi}acético:



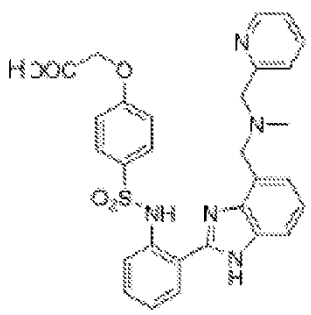
10

- el ácido {4-[2-{4-[(diethylamino)metil]-1H-bencimidazol-2-il}fenil-sulfamoil]fenoxi}acético:



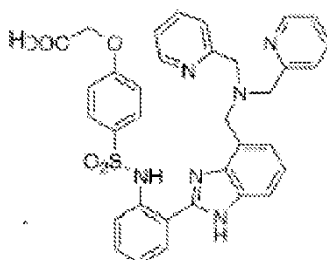
15

- el ácido {4-[2-{4-[(metilpiridin-2-ilmetilamino)-metil]-1H-bencimidazol-2-il}fenilsulfamoil]fenoxi}acético:



20 y

- el ácido {4-[2-{4-[(bispiridin-2-ilmetilamino)metil]-1H-bencimidazol-2-il}fenilsulfamoil]fenoxi}acético:



Preferentemente, el quimiodetector utilizado en la composición según la invención se selecciona entre las cumarinas hidrófilas y los derivados del bencimidazol.

Más preferentemente, el quimiodetector utilizado en la composición según la invención es el azul de calceína o la N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)metiliden]amina.

Más preferentemente, el quimiodetector utilizado en la composición según la invención es el azul de calceína.

Dicho quimiodetector selectivo se asocia a un catión para formar un complejo quimiodetector-catión inactivado.

Preferentemente, el catión es un metal de transición, preferentemente seleccionado entre el Co^{2+} , el Cr^{3+} , el Cu^{2+} , el Fe^{2+} , el Fe^{3+} , el Mn^{2+} , el Ni^{2+} , el Hg^{2+} y el Pb^{2+} .

Más preferentemente, el catión utilizado en la composición según la invención es el Co^{2+} o el Cu^{2+} .

Preferentemente, el complejo quimiodetector-catión inactivado se selecciona entre:

(i) las cumarinas hidrófilas inactivadas por un ion metálico tales como los complejos:

- 7-(dietilamino)-2-oxo-N-((piridin-2-il)metil)-2H-cromeno-3-carboxamida - ion cobre (Cu^{2+});

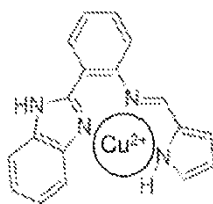
- N-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida - ion férrico (Fe^{3+});

- Calceína - ion férrico (Fe^{3+});

- azul de calceína - ion Cobalto (Co^{2+});

(ii) los derivados de bencimidazol soluble en agua inactivados por un ion metálico tales como los complejos:

- N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)metiliden] aminado - ion cobre (Cu^{2+}), de fórmula (II) siguiente:



(II) ;

- el macrociclo N, S de derivado del bis-bencimidazol, inactivado por un ion seleccionado entre Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} ;

- el ácido {4-[2-(1H-benzimidazol-2-il)-fenil-sulfamoil]fenoxi}acético, inactivado por un ion seleccionado entre Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} ;

- el ácido {4-[2-[4-[(dietilamino)metil]-1H-benzimidazol-2-il]fenilsulfamoil]fenoxi}acético, inactivado por un ion seleccionado entre Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} ;

- el ácido {4-[2-[4-[(metilpiridin-2-ilmetilamino)-metil]-1H-benzimidazol-2-il]-fenilsulfamoil]fenoxi}acético, inactivado por un ion seleccionado entre Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} ; y

- el ácido {4-[2-[4-[(bispiridin-2-ilmetilamino)-metil]-1H-benzimidazol-2-il]fenilsulfamoil]-fenoxi}acético, inactivado por un ion seleccionado entre Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} .

Más preferiblemente aún, el complejo quimiodetector-catión inactivado se selecciona entre:

- azul de calceína - ion conalto (Co^{2+}) y

5 - N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)metiliden]-amina - ion cobre (Cu^{2+}).

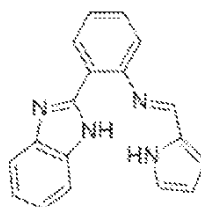
Dicho complejo quimiodetector-catión inactivado permite, después de la reacción enzimática, la formación de un segundo producto fluorescente "A*" que resulta de la separación del catión del quimiodetector fluorescente, uniéndose el catión con el anión por un enlace iónico.

10 Este segundo producto fluorescente es, como el producto fluorescente "S*", procedente de la reacción enzimática detallada en la ecuación (2), preferiblemente excitado a una longitud de onda comprendida entre 250 y 450 nm y emite a una longitud de onda comprendida entre 300 y 600 nm.

15 Ventajosamente, el segundo producto fluorescente se excita también a una longitud de onda comprendida entre 300 y 400 nm y emite a una longitud de onda comprendida entre 400 y 500 nm.

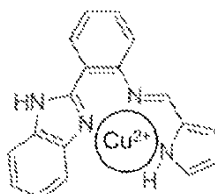
Más preferiblemente aún, el primer producto fluorescente y el segundo producto fluorescente se excitan y emiten a unas longitudes de ondas sustancialmente idénticas.

20 Saluja P. *et al.*, 2012 divulga el compuesto N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)metiliden]amina de fórmula (I) siguiente:



(I)

25 Este compuesto (I) es fluorescente por defecto. Sin embargo, cuando el compuesto (I) se asocia a un catión tal como Cu^{2+} , forma un complejo quimiodetector-catión inactivado de fórmula (II):



(II)

30 Finalmente, la presencia en el medio de un anión tal como el fosfato inorgánico generará el enlace del catión Cu^{2+} con el ion fosfato, liberando de nuevo el compuesto (I) fluorescente.

35 De manera particularmente ventajosa, la composición según la invención asocia un sustrato enzimático fluorogénico que es el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) y un complejo quimiodetector-ion inactivado que es el complejo azul de calceína - ion Cobalto (Co^{2+}).

La composición de la invención puede también comprender otros compuestos útiles en el ámbito del ensayo biológico tales como unos tampones por ejemplo.

40 El sustrato enzimático fluorogénico (sustrato primario) y el compuesto fluorogénico inactivado (sustrato secundario) presentes en la composición de la invención pueden estar contenidos en un medio sólido, por ejemplo un polvo sólido, o en un medio líquido.

45 Por "medio sólido o líquido", se entiende designar un medio en forma sólida o líquida compatible con la muestra a analizar susceptible de contener al menos un analito representativo a detectar.

Preferentemente, el sustrato enzimático fluorogénico y el compuesto fluorogénico inactivado presentes en la composición de la invención están contenidos en un medio líquido para el inmunoensayo enzimático.

El analito a determinar puede ser una proteína, un péptido o un hapteno, a saber una reacción que implica como compañero(s) de unión unos antígenos y/o unos anticuerpos, unos receptores del analito, etc.

La muestra a ensayar en el ámbito de la invención puede tener diversos orígenes, por ejemplo de origen alimentario, medioambiental, biológico, veterinario, clínico, farmacéutico o cosmético.

Entre las muestras de origen alimentario, se puede citar, de manera no exhaustiva, una muestra de productos lácteos (yogures, quesos, etc.), de carne, de pescado, de huevo, de fruta, de verdura, de agua, de bebida (leche, zumo de fruta, soda, etc.). Por supuesto, estas muestras de origen alimentario pueden también provenir de salsas o de platos más elaborados o de materias primas no transformadas o parcialmente transformadas. Una muestra alimentaria puede también proceder de una alimentación destinada a los animales, tales como tortas, harinas animales. Todas estas muestras, si no son líquidas, son previamente tratadas para estar en forma líquida.

Tal como se ha indicado anteriormente, la muestra puede ser de origen medioambiental y puede consistir, por ejemplo, en una extracción de superficie, de agua, etc.

La muestra puede también consistir en una muestra biológica, de origen humano o animal, que puede corresponder a unas extracciones de fluido biológico (orina, sangre total o derivados tales como suero o plasma, saliva, pus, líquido cefalorraquídeo, etc.), heces (por ejemplo diarreas coléricas), de extracciones nasales, de garganta, de piel, de heridas, de órganos, de tejidos o de células aisladas, de muestras de hisopo. Por supuesto, esta lista no es exhaustiva.

De manera general, el término "muestra" se refiere a una parte o a una cantidad, más particularmente una pequeña parte o una pequeña cantidad, extraída a partir de una o varias entidades con fines de análisis. Esta muestra puede eventualmente haber sufrido un tratamiento previo, que implica por ejemplo unas etapas de mezcla, de dilución o también de trituración, en particular si la entidad de partida está en estado sólido.

La muestra analizada es, en general, susceptible de, o sospechosa de, contener al menos un analito representativo de la presencia de microorganismos o de una enfermedad a detectar, caracterizar o seguir.

La invención tiene como otro objeto un kit para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia de un analito susceptible de estar contenido en una muestra de prueba, que comprende una composición tal como se ha definido anteriormente.

Por supuesto, el término "inmuno" en "inmunoensayo" por ejemplo, no debe considerarse en la presente solicitud como indicando estrictamente que el compañero de unión es un compañero inmunológico, tal como un anticuerpo. En efecto, el experto en la materia utiliza también ampliamente este término cuando el compañero de unión, también denominado ligando, no es un compañero inmunológico sino que es por ejemplo un receptor al analito que se desea evaluar. Así, se conoce hablar del ensayo ELISA (*Enzima-Linked Immunosorbent Assay*) literalmente "ensayo de inmunoabsorción por enzima enlazada") para ensayos que utilizan unos compañeros de unión no inmunológicos, denominados más ampliamente en inglés "*Ligand Binding Assay*", que se podría traducir por "Ensayo que utiliza el enlace a un ligando", mientras que el término "inmuno" está incluido en el acrónimo ELISA. Para más claridad, la solicitante utilizará en toda la solicitud el término de "inmuno" para cualquier ensayo que utilice un compañero de unión, incluso cuando no es un compañero inmunológico.

La invención tiene por objeto también un dispositivo automatizado de inmuno-análisis que comprende tal composición. Un dispositivo automatizado de inmuno-análisis es un dispositivo automatizado de análisis biológicos que permite realizar un cierto número de análisis biológicos en un tiempo limitado. Los dispositivos automatizados de inmuno-análisis según la invención permiten por ejemplo el ensayo de los marcadores cardíacos, el resultado tiroideo, el resultado anémico, el ensayo de los marcadores tumorales, el resultado de fertilidad, la respuesta vírica, la presencia de bacterias o de proteínas bacterianas. A título de ejemplos no limitativos de dispositivos automatizados, se pueden citar los dispositivos automatizados:

* Access® 2, UniCel™ Dxl 600 y UniCel™ Dxl 800, comercializados por la compañía Beckman Coulter;

* Advia Centaur™ y Immulite™ comercializados por la compañía Siemens;

* Vitros™ comercializados por la compañía Ortho-Clinical-Diagnostics;

* VIDAS® comercializados por la solicitante;

* Architect™ comercializados por la compañía Abbott Diagnostics; y

* Elecsys™ comercializados por la compañía Roche Diagnostics.

Preferentemente, el dispositivo automatizado es el VIDAS®, el VIDAS® 3 o el mini VIDAS®, comercializados por la solicitante.

La invención se refiere también a la utilización de una composición, de un kit o de un dispositivo automatizado tales como se describen anteriormente, para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia de un analito de interés.

El análisis de muestras por inmunoensayo enzimático utiliza una reacción entre el analito de interés y uno o más compañeros de unión específicos al analito. Estos compañeros de unión pueden utilizarse como compañeros de captura, como compañero de detección, o como compañeros de captura y de detección según el ensayo utilizado.

A título de compañero de unión al analito, se pueden citar los anticuerpos, las fracciones de anticuerpos, las nanofitinas, los receptores a este analito o cualquier otro receptor molecular conocido por tener una interacción con el analito a buscar.

Los anticuerpos compañeros de unión son, por ejemplo, unos anticuerpos policlonales, o bien unos anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse por inmunización de un animal con el analito o una parte inmunogénica del analito, seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpos de los otros constituyentes del suero, especialmente por cromatografía de afinidad sobre una columna sobre la cual está fijado un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, especialmente el analito.

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse mediante la técnica de los hibridomas, cuyo principio general se recuerda a continuación.

En un primer tiempo, se inmuniza un animal, generalmente un ratón con el analito o una parte inmunogénica del analito de interés del cual los linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra este antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos se fusionan después con unas células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a unos hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, llevando cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento frente a dicho analito diana podrán analizarse por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia (transferencia Western) en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados se purifican a continuación, especialmente según la técnica de cromatografía de afinidad descrita anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser también unos anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

A título de ejemplo de fragmentos de anticuerpos, se pueden citar los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, así como las cadenas scFv (Single chain variable fragment), dsFv (Double-stranded variable fragment). Estos fragmentos funcionales pueden obtenerse especialmente por ingeniería genética.

Las nanofitinas (nombre comercial) son pequeñas proteínas que, como los anticuerpos, son capaces de enlazarse a una diana biológica que permite así detectarla, capturarla o simplemente enfocarla dentro de un organismo.

Los compañeros de unión pueden ser específicos o no del analito a detectar. Se denominan específicos cuando son capaces de unirse de manera exclusiva o casi-exclusiva a estos analitos. Se denominan no específicos cuando la selectividad de unión a estos analitos es débil y que son entonces capaces de unirse a otros ligandos, tales como otras proteínas o anticuerpos. Según un modo de realización preferido, se utilizan unos compañeros de unión específicos.

La detección del analito se efectúa midiendo una señal generada después de la puesta en presencia del complejo formado entre el analito y los compañeros de unión y de la composición según la invención. Se realiza mediante un método de visualización de una fluorescencia, por medio de un marcado, o bien del compañero de detección directa o indirectamente (método sándwich), o bien del analito en sí o de uno o varios de sus fragmentos (método por competición).

Por marcado, se entiende la fijación de una enzima capaz de hacer generar en el medio de reacción una señal detectable por fluorescencia como, por ejemplo, la fosfatasa alcalina después de la hidrólisis de un sustrato enzimático fluorogénico apropiado tal como el 4-MUP.

La invención se refiere también a un procedimiento y/o cuantificación *in vitro* de un analito por inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia de tipo sándwich, en una muestra líquida de prueba susceptible de contener

dicho analito, que comprende las etapas siguientes de:

- poner en contacto un compañero de captura, previamente fijado o no fijado sobre una superficie sólida, y de dicha muestra líquida para la fijación del analito sobre el compañero de captura;

- añadir un compañero de detección, el cual se acopla directa o indirectamente a una enzima capaz de lisar el sustrato enzimático fluorogénico de una composición de la invención, para la fijación sobre el complejo compañero de captura-analito;

- poner en contacto una composición de la invención y del complejo compañero de captura-analito-compañero de detección para la formación de un medio de reacción; y

- detectar por inmunofluorescencia la presencia y/o de la cantidad de analito midiendo la fluorescencia emitida en el medio de reacción, es decir el medio que contiene el primer producto y el segundo producto de fluorescencia tales como se han descrito anteriormente.

Por acoplamiento directo o indirecto de la enzima sobre el compañero de detección, se entiende que la enzima está fijada directamente sobre el compañero de detección que reconoce el analito (acoplamiento directo) o bien la enzima está acoplada a un compañero de unión que reconoce el compañero de detección que reconoce ella misma el analito (acoplamiento indirecto).

Así, en el ámbito del acoplamiento directo, el complejo formado al final del ensayo se constituirá de:

“Compañero de captura/analito/compañero de detección acoplado a la enzima”.

En el ámbito del acoplamiento indirecto, el complejo formado al final del ensayo se constituirá de:

“Compañero de captura/analito/compañero de detección/compañero de unión acoplado a la enzima”. En el ámbito de este último modo de realización, el compañero de unión es bien conocido por el experto en la materia y puede, por ejemplo, ser un anticuerpo anti-IgG (inmunoglobulina) cuando el compañero de detección es una IgG que reconoce el analito de interés.

La invención se refiere también a un procedimiento de detección y/o cuantificación *in vitro* de un analito por inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia de tipo competición, en una muestra líquida de prueba susceptible de contener dicho analito, que comprende las etapas siguientes de:

- poner en contacto un compañero de captura, previamente fijado o no fijado sobre una superficie sólida, de un análogo al analito acoplado a una enzima capaz de lisar el sustrato enzimático fluorogénico de una composición de la invención, y de dicha muestra líquida, los cuales entran en competición para la fijación sobre el compañero de captura;

- poner en contacto una composición de la invención y de los complejos compañero de captura-analito y compañero de captura-análogo al analito para la formación de un medio de reacción; y

- detectar por inmunofluorescencia la presencia y/o de la cantidad de analito midiendo la fluorescencia emitida en el medio de reacción, es decir el medio que contiene los primero y segundo productos de fluorescencia tales como se han descrito anteriormente.

Salvo la utilización de la composición de la invención, las etapas de estos procedimientos son unas etapas clásicas ampliamente conocidas por el experto en la materia.

Por otro lado, los procedimientos de la invención pueden también comprender una o varias etapas suplementarias de aclarado después de cada etapa, como por ejemplo:

- antes de la adición del compañero de detección, una etapa de aclarado de manera a eliminar el analito no unido al complejo compañero de captura-analito; y

- después de la adición del compañero de detección, una etapa de aclarado para eliminar el compañero de detección no unido,

lo que constituye otro modo de realización de la invención.

Las etapas de aclarado son unas etapas conocidas por el experto en la materia. Se realizan con unos tampones compatibles con el medio de reacción y la lectura de fluorescencia.

Finalmente, la invención se refiere a un procedimiento de mejora de la sensibilidad de un procedimiento de

detección y/o cuantificación *in vitro* por inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia de un analito a detectar en una muestra de prueba susceptible de contener el analito, caracterizado por que comprende la utilización, durante la realización del ensayo, de una composición o de un kit según la invención.

- 5 La presente invención se ilustrará ahora mediante los ejemplos siguientes, lo cuales no son dados de manera limitativa.

Ejemplo 1: Aumento de la fluorescencia por activación del sustrato enzimático fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) acoplada a la detección selectiva del fosfato inorgánico Pi.

1. Principios generales:

1.1. *Reacción estándar:*

15 Como se esquematiza en la figura 1, la etapa actual de detección por inmunofluorescencia de la presencia de un analito en los inmunoensayos realizada en el instrumento VIDAS® (bioMérieux) se basa en la activación del sustrato enzimático fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP), contenido en la última cuba (pocillos 10 o XA) de la tira VIDAS®.

20 En la configuración actual, durante la última mezcla de cada ensayo realizado en el instrumento VIDAS®, la señal generada por la enzima fosfatasa alcalina (PAL o AP) es proporcional a la cantidad de analito a ensayar (método sándwich) o inversamente proporcional a tal cantidad (método por competición). La enzima se fija indirectamente a las paredes del receptáculo en fase sólida (SPR® por Solid Phase Receptacle) a través de la formación del complejo compañero de captura/analito/compañero de detección unido a la PAL o compañero de captura/análogo del analito
25 unido a la PAL, según el tipo de inmunoensayo elegido, y reacciona con el sustrato enzimático fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) para generar dos productos:

- la 4-metilumbeliferona (4-MU) que es una molécula altamente fluorescente cuya fluorescencia se mide por el cabezal óptico del instrumento VIDAS®; y

- el ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} (o Pi por fosfato inorgánico en todas sus formas) que permanece en la solución sin presentar un papel particular.

La figura 1 esquematiza esta reacción conocida.

1.2. *Reacción mejorada:*

La figura 2 esquematiza una reacción mejorada de detección por inmunofluorescencia según la invención. Esta reacción consiste por un lado en la activación clásica de un sustrato enzimático fluorogénico, que es aquí el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP). Esta reacción está, por otro lado, optimizada gracias a un complejo quimiodetector-catión inactivado (rombo "A-cat" esquematizado en la figura 2).

45 Como para la reacción esquematizada en la figura 1, el sustrato enzimático fluorogénico primario 4-MUP se convierte por la enzima fosfatasa alcalina (PAL) en 4-metilumbeliferona (4-MU) y en ion hidrogenofosfato HPO_4^{2-} (Pi por fosfato inorgánico en todas sus formas). Este ion fosfato (Pi) resultante reacciona con el complejo quimiodetector-catión inactivado (sustrato secundario) para liberar en el medio por un lado el compuesto fluorescente "A*" y por otro lado para formar un producto que asocia el ion fosfato (Pi) con el catión "cat"

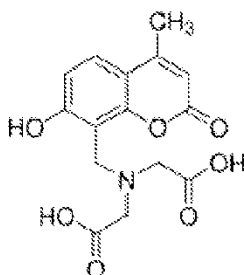
50 Así, el método propuesto aquí consiste en añadir al primer sustrato, que es en este ejemplo el sustrato enzimático fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP), un sustrato secundario, que es un complejo quimiodetector-catión inactivado. Este sustrato secundario es apto para activarse a continuación por un anión, que es en este ejemplo el fosfato inorgánico Pi, y que permitirá generar una señal adicional (véase el esquema de la figura 2).

55 El complejo fluorescente así formado, que asocia el quimiodetector selectivo al fosfato inorgánico contribuye a reforzar la señal global generada por la reacción primaria del 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP).

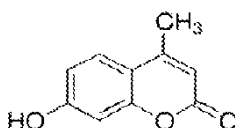
2. Realización de la reacción con el fluoróforo "azul de calceína":

60 Como se ilustra en la figura 3, la reacción mejorada detallada en el punto 1.2 anterior se ha realizado por la solicitante utilizando como sustrato secundario el complejo que asocia el quimiodetector "azul de calceína" (CB por "Calcein Blue") inactivado por el catión Cobalt (Co^{2+})

El azul de calceína o ácido 4-metilumbeliferona-8-metiliminodiacético es un compuesto cuya fórmula general se recoge a continuación:



El azul de calceína es una cumarina fluorófora que presenta unas características parecidas a la 4-metilumbeliferona (4-MU) de fórmula general:



Esto significa que el azul de calceína es compatible con los sistemas VIDAS®.

El complejo quimiodetector-catión inactivado que asocia azul de calceína e ion cobalto ("CB-Co") se ha seleccionado como candidato potencial por las razones siguientes:

- es selectivo para el fosfato inorgánico Pi;

- está, como se ilustra en la figura 4, bien activado por unas concentraciones crecientes de fosfato inorgánico Pi. La figura 4 ilustra en efecto que el complejo quimiodetector-catión inactivado que asocia azul de calceína e ion cobalto ("CB-Co") se activa por unas concentraciones crecientes de fosfato inorgánico Pi y permite la liberación de azul de calceína fluorescente en función de dicha concentración en fosfato inorgánico Pi;

- es soluble en agua;

- se excita a una longitud de onda de 370 ± 5 nm y emite a una longitud de onda de 450 ± 20 nm.

- posee, como se ilustra en la figura 5, una intensidad de fluorescencia comparable a la 4-metilumbeliferona (4-MU). La figura 5 compara el espectro de emisión de las dos soluciones siguientes que comprenden azul de calceína (CB) para la primera y 4-metilumbeliferona (4-MU) para la segunda:

* una solución a pH 9,4 que comprende 6410 nM de azul de calceína, 0,6 mM de dietanolamina (DEA); 0,3 mM de ácido etileno diamina tetraacético (EDTA- Na_2) y 0,5 mM de MgCl_2 ; y

* una solución VIDAS® OPT que comprende 6410 nM (6,4 μM) de sustrato enzimático fluorogénico 4-metil-umbeliferil fosfato (4-MUP);

- la unión entre el azul de calceína y el ion Cobalto (Co^{2+}) es estable a diferentes pH, incluso a pH 9,2 que corresponde al pH del VIDAS XA;

- el complejo quimiodetector-catión que asocia azul de calceína e ion cobalto ("CB-Co") está, como se ilustra en la figura 6, inactivado, es decir que no es fluorescente antes de la separación del ion Cobalto (Co^{2+}).

Por otro lado, la Solicitante ha podido evidenciar que la intensidad de la fluorescencia, después de la separación del ion Cobalto (Co^{2+}) se quedaba constante durante un tiempo de al menos 20 minutos.

Ejemplo 2: Mejora de la emisión de fluorescencia utilizando una composición según la invención

1. Preparación de las soluciones a analizar

Se ha preparado un tampón pH 8,2 con los compuestos siguientes:

- Tris-Base + HCl (pH final de 8,2)

- $[\text{Mg}^{2+}]$ 0,7mM

- $[\text{EDTA-Na}_2]$ 0,03mM

- $[\text{Co}^{2+}]$ 0,03mM

5 Se prepararon tres soluciones diferentes con la adición del sustrato enzimático fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) y/o del complejo quimiodetector-catión inactivado que asocia azul de calceína e ion cobalto ("CB-Co"). Se trata de las soluciones A, B y C siguientes:

Solución A: 0,64 μM de 4-MUP (forma ácido libre)

10 Solución B: 6,4 μM de CB-Co

Solución C: 0,64 μM de 4-MUP + 6,4 μM de CB-Co

2. Prueba de estabilidad de las soluciones A y B:

15 La estabilidad de las soluciones A y B se ha analizado controlando su fluorescencia a lo largo del tiempo, con el fin de verificar que se evitan la hidrólisis espontánea del sustrato enzimático fluorogénico 4-MUP y el desplazamiento de ion Cobalto (Co^{2+}) del azul de calceína CB.

20 Las tablas 1a. y 1b. a continuación dan los resultados en unidades de fluorescencia relativas (RFU del inglés "Relative Fluorescence Units"), medidas con la ayuda de la cabeza de lectura escáner del instrumento VIDAS® 3, obtenidas poniendo en el instrumento tres tiras llenas de la solución A y tres tiras llenas de la solución B.

25 La lectura de los resultados se realiza con la ayuda de un ordenador portátil externo que utiliza el programa VN Test Suite SW que controla la cabeza del escáner del instrumento VIDAS®.

Tabla 1a.: resultados obtenidos para la solución A (0,64 μM 4-MUP)

Tris-base + HCl 8,2 [Mg] 0,7 mM [EDTA] 0,03 mM [Co] 0,03 mM							
Solución A (4-MUP 0,64 μM)							
	t0 (RFU)	t5min (RFU)	t10min (RFU)	t15min (RFU)	t20min (RFU)	t25min (RFU)	t30min (RFU)
Tira 1	34	32	33	33	32	33	33
Tira 2	30	29	29	29	29	30	30
Tira 3	33	32	31	31	32	32	32

30 Tabla 1b. resultados obtenidos para la solución B (0,64 μM CB-Co):

Tris-base + HCl 8,2 [Mg] 0,7 mM [EDTA] 0,03 mM [Co] 0,03 mM							
Solución B (CB-Co 0,64 μM)							
	t0 (RFU)	t5min (RFU)	t10min (RFU)	t15min (RFU)	t20min (RFU)	t25min (RFU)	t30min (RFU)
Tira 1	34	34	34	34	34	34	33
Tira 2	41	43	43	43	43	43	42
Tira 3	36	43	44	45	45	44	43

35 Los resultados muestran que la fluorescencia de las composiciones permanece constante y débil. Así, las dos soluciones A y B son estables en el tiempo, lo que demuestra que el sustrato enzimático fluorogénico 4-MUP no se hidrolizó espontáneamente y se evita que el desplazamiento de ion Cobalto (Co^{2+}).

3. Comparación de las fluorescencias de las soluciones A y C:

Después de esta prueba de estabilidad, se realiza el siguiente ensayo, tres veces:

40 Etapa 1: Se rellenaron tres tiras (pocillo XA) con 300 μl de la solución A y se rellenaron tres tiras con la solución C. Las tiras se cargaron en el instrumento VIDAS® 3;

45 Etapa 2: El valor del ruido de fondo (BKG por "background") se mide por el cabezal del escáner del instrumento VIDAS® en el tiempo t0 para cada tira;

Etapa 3: La enzima fosfatasa alcalina (PAL) se añade en cada cubeta (10 μl a 500 $\mu\text{g/ml}$);

Etapa 4: La fluorescencia de cada cubeta se mide durante un tiempo de 15 minutos en instantes determinados;

50

Etapa 5: Se calcula el aumento de la fluorescencia. Se determina el valor de fluorescencia relativa (RFV por Relative Fluorescence Value) sustrayendo el valor del ruido de fondo (BKG) del valor de la última lectura a t=15 minutos.

Se ha elegido una duración de 15 minutos a fin de asegurarse que el sustrato enzimático fluorogénico 4-MUP contenido en la solución A está completamente activado en 4-MU.

Por otro lado, la fluorescencia obtenida con la solución A después de 15 minutos es homogénea con la fluorescencia para una concentración en 4-metilumbeliferona (4-MU) de 0,6410 μM obtenida diluyendo 1/10 de una solución VIDAS® OPT (a 6,41 μM) en el mismo tampón.

Los resultados brutos de la prueba realizado tres veces se recogen en las tablas 2a. y 2b. siguientes:

Tabla 2a. resultados obtenidos para la solución A (0,64 μM 4-MUP)

Tris-base + HCl 8,2 [Mg] 0,7 mM [EDTA] 0,03 mM [Co] 0,03 mM					
4-MUP 0,64 μM					
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 μl 500 $\mu\text{g/ml}$	t 5min (RFU)	t 10min (RFU)	t 15min (RFU)
Tira 1,1	45	330	321	318	317
Tira 1,2	45	302	295	291	291
Tira 1,3	58	258	251	249	250
Tira 2,1	46	295	291	289	288
Tira 2,2	68	297	282	280	280
Tira 2,3	46	291	284	285	286
Tira 3,1	45	321	311	309	309
Tira 3,2	45	338	330	330	333
Tira 3,3	43	329	321	319	319

Tabla 2b.: resultados obtenidos para la solución C (6,4 μM CB-Co + 0,64 μM 4-MUP)

Tris-base + HCl 8,2 [Mg] 0,7 mM [EDTA] 0,03 mM [Co] 0,03 mM					
CB-Co 6,4 μM + 4-MUP 0,64 μM					
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 μl 500 $\mu\text{g/ml}$	t 5min (RFU)	t 10min (RFU)	t 15min (RFU)
Tira 1,1	109	387	463	501	516
Tira 1,2	107	381	443	489	513
Tira 1,3	110	386	458	503	523
Tira 2,1	97	335	404	471	526
Tira 2,2	95	333	390	454	525
Tira 2,3	95	324	388	426	477
Tira 3,1	99	364	460	529	579
Tira 3,2	96	378	441	489	529
Tira 3,3	94	369	475	524	527

Finalmente, la tabla 2c. siguiente recoge los valores relativos de fluorescencia (RFV) para el conjunto de las pruebas efectuadas y los porcentajes de aumento de la fluorescencia correspondientes.

Tabla 2c:

	Solución A (4-MUP)	Solución C (4-MUP + CB-Co)	Aumento (%)
	t 15 min - BKG		
	RFV	RFV	
Tira 1,1	272	407	
Tira 1,2	246	406	
Tira 1,3	192	413	
RFV media ensayo 1	237	409	72%
Tira 2,1	242	429	
Tira 2,2	212	430	
Tira 2,3	240	382	
RFV media ensayo 2	231	414	79%
Tira 3,1	264	480	
Tira 3,2	288	433	
Tira 3,3	276	433	
RFV media ensayo 3	276	449	62%

Como se detalla en la tabla 2c. anterior, la fluorescencia media aumenta de aproximadamente un 70% entre la solución A y la solución C que contiene la asociación del sustrato enzimático fluorogénico 4-MUP y del complejo quimiodetector-catión inactivado CB-Co según la invención.

- 5 Así la adición de un quimiodetector-catión inactivado permite aumentar la señal fluorescente de manera significativa.

Ejemplo 3: Utilización de diferentes concentraciones de sustrato primario en una composición según la invención:

- 10 Pruebas preliminares con un complejo quimiodetector-catión inactivado que asocia azul de calceína e ion cobalto ("CB-Co"):

La solicitante ha deseado evaluar el aumento de la fluorescencia por adición de complejo quimiodetector-catión inactivado CB-Co en una solución que comprende diferentes concentraciones de sustrato enzimático fluorogénico 4-MUP, con respecto a una solución que comprende únicamente el sustrato enzimático fluorogénico 4-MUP, y esto a estas mismas concentraciones.

1. Preparación de las soluciones a analizar

- 20 Se ha preparado un tampón pH 8,2 como se describe en el ejemplo 2 anterior.

Se consideraron tres concentraciones diferentes de 4-MUP, se trata de las concentraciones siguientes:

(1) 0,64 μM

(2) 0,43 μM

(3) 0,32 μM .

- 30 Para cada concentración, se han preparado tres soluciones diferentes:

(1) *Concentración 0,64 μM :*

- Solución A1: 0,64 μM de 4-MUP (forma ácido libre)

- Solución B1: 6,4 μM de CB-Co

- Solución C1: 0,64 μM de 4-MUP + 6,4 μM de CB-Co

(2) *Concentración 0,43 μM :*

- Solución A2: 0,43 μM de 4-MUP (forma ácido libre)

- Solución B2: 6,4 μM de CB-Co

- Solución C2: 0,43 μM de 4-MUP + 6,4 μM de CB-Co

(3) *Concentración 0,32 μM :*

- Solución A3: 0,32 μM de 4-MUP (forma ácido libre)

- Solución B3: 6,4 μM de CB-Co

- Solución C3: 0,32 μM de 4-MUP + 6,4 μM de CB-Co.

2. Sección experimental:

Cada experimento se ha efectuado por triplicado y repetido tres veces, para cada concentración de 4-MUP analizada. La tabla 3 siguiente recoge el esquema del plano de cargamento del VIDASTM para una concentración de 0,64 μM de 4-MUP:

Tabla 3

Muestras	Sección A		
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3
	CB-Co 6,4 μM	vacío	vacío

	Sección B		
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3
	4-MUP 0,64 μ M	4-MUP 0,64 μ M	4-MUP 0,64 μ M
	Sección C		
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3
	4-MUP 0,64 μ M + CB-Co 6,4 μ M	4-MUP 0,64 μ M + CB-Co 6,4 μ M	4-MUP 0,64 μ M + CB-Co 6,4 μ M

Las soluciones B1, B2 y B3 constituyen un control de la estabilidad del complejo quimiodetector-catión inactivado CB-Co. Permiten asegurar que el aumento de la fluorescencia observada está claramente relacionado con la acción del ion fosfato (Pi) i sobre el catión Co, y no a la acción de quelación del EDTA sobre el complejo quimiodetector-catión inactivado CB-Co.

Las pruebas siguientes se realizaron tres veces cada una (sesión 1, sesión 2, sesión 3) para cada concentración de 4-MUP. La figura 8 recoge las grandes etapas de las pruebas realizadas. La figura 8 esquematiza las diferentes etapas de la prueba que permiten determinar la fluorescencia adicional generada por un compuesto fluorescente según la invención.

Las diferentes etapas de la prueba se recogen a continuación:

(i) La medición del plástico de cada tira vacía se realiza con la ayuda de la cabeza escáner del instrumento VIDAS® 3;

(ii) Las tiras se rellenan (pocillo XA) de la siguiente manera:

a. Sección A → 1 tira rellena con 300 μ l de la solución B (B1, B2 o B3);

b. Sección B → 3 tiras rellenas con 300 μ l de la solución A (A1, A2 o A3);

c. Sección C → 3 tiras rellenas con 300 μ l de la solución C (C1, C2 o C3).

(iii) Las tiras se cargan en un VIDAS® 3 EP VN 1015;

(iv) La lectura del ruido de fondo (BKG) se realiza a T0 para cada tira por la misma cabeza escáner;

(v) La enzima fosfatasa alcalina (PAL) se añade, en exceso, en cada cubeta (10 μ l a 500 μ g/ml);

(vi) La fluorescencia de cada cubeta se mide cada cinco minutos durante quince minutos;

(vii) El valor de fluorescencia relativa (RFV por Relative Fluorescencia Value) se determina sustrayendo el valor del ruido de fondo (T0) del valor de la última lectura a t=15 minutos.

Los resultados de las diferentes pruebas realizadas tres veces, a diferentes concentraciones en 4-MUP (0,64 μ M, 0,43 μ M y 0,32 μ M) se recogen en las tablas siguientes:

I. Pruebas durante las sesiones 1, 2 y 3 para una concentración de 4-MUP de 0,64 μ M:

Tabla 4a. resultados obtenidos para la solución A1 (0,64 μ M 4-MUP)

4-MUP 0,64 μ M			
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 μ l 500 μ g/ml	t 15min (RFU)
Tira 1,1	45	330	317
Tira 1,2	45	302	291
Tira 1,3	58	258	250
Tira 2,1	46	295	288
Tira 2,2	68	297	280
Tira 2,3	46	291	286
Tira 3,1	45	321	309
Tira 3,2	45	338	333
Tira 3,3	43	329	319

Tabla 4b. resultados obtenidos para la solución B1 (CB-Co 6,4 μ M)

CB-Co 6,4 μ M			
	T0 (RFU) BKG	T 30sec (RFU)	t 15min (RFU)
Tira 1,1	68	68	67

ES 2 718 736 T3

Tira 2,1	62	64	63
Tira 3,1	86	87	86

Tabla 4c.: resultados obtenidos para la solución C1 (6,4 μ M CB-Co + 0,64 μ M 4-MUP)

CB-Co 6,4 μ M + 4-MUP 0,64 μ M			
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 μ l 500 μ g/ml	t 15min (RFU)
Tira 1,1	109	387	516
Tira 1,2	107	381	513
Tira 1,3	110	386	523
Tira 2,1	97	335	526
Tira 2,2	95	333	525
Tira 2,3	95	324	477
Tira 3,1	99	364	579
Tira 3,2	96	378	529
Tira 3,3	94	369	527

- 5 Tabla 4d: Valores relativos de fluorescencia (RFV) para el conjunto de las pruebas efectuadas a una concentración en 4-MUP de 0,64 μ M.

	Solución A1 (4-MUP)	Solución C1 (4-MUP + CB-Co)
	t 15 min - BKG	
	RFV	RFV
Tira 1,1	272	407
Tira 1,2	246	406
Tira 1,3	192	413
Tira 2,1	242	429
Tira 2,2	212	430
Tira 2,3	240	382
Tira 3,1	264	480
Tira 3,2	288	433
Tira 3,3	276	433

II. Pruebas durante las sesiones 1, 2 y 3 para una concentración de 4-MUP de 0,43 μ M:

10

Tabla 5a.: resultados obtenidos para la solución A2 (0,43 μ M 4-MUP)

4-MUP 0,43 μ M			
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 μ l 500 μ g/ml	t 15min (RFU)
Tira 1,1	52	218	211
Tira 1,2	44	191	184
Tira 1,3	44	192	184
Tira 2,1	50	224	213
Tira 2,2	50	228	217
Tira 2,3	57	211	200
Tira 3,1	51	227	224
Tira 3,2	55	222	219
Tira 3,3	52	231	229

Tabla 5b. resultados obtenidos para la solución B2 (CB-Co 6,4 μ M)

15

CB-Co 6,4 μ M			
	T0 (RFU) BKG	T 30sec (RFU)	t 15min (RFU)
Tira 1,1	62	62	61
Tira 2,1	61	62	62
Tira 3,1	63	61	61

Tabla 5c.: resultados obtenidos para la solución C2 (6,4 μ M CB-Co + 0,43 μ M 4-MUP)

CB-Co 6,4 μ M + 4-MUP 0,43 μ M			
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 μ l 500 μ g/ml	t 15min (RFU)
Tira 1,1	76	273	282
Tira 1,2	79	260	270

Tira 1,3	70	264	275
Tira 2,1	86	312	350
Tira 2,2	84	316	359
Tira 2,3	79	286	328
Tira 3,1	78	338	368
Tira 3,2	83	344	361
Tira 3,3	82	332	362

Tabla 5d: Valores relativos de fluorescencia (RFV) para el conjunto de las pruebas efectuadas a una concentración en 4-MUP de 0,43 μ M.

	Solución A2 (4-MUP)	Solución C2 (4-MUP + CB-Co)
	t 15 min - BKG	
	RFV	RFV
Tira 1,1	159	206
Tira 1,2	140	191
Tira 1,3	140	205
Tira 2,1	163	264
Tira 2,2	167	275
Tira 2,3	143	249
Tira 3,1	173	290
Tira 3,2	164	278
Tira 3,3	177	280

5

III. Pruebas durante las sesiones 1, 2 y 3 para una concentración de 4-MUP de 0,32 μ M:

Tabla 5a.: resultados obtenidos para la solución A3 (0,32 μ M 4-MUP)

4-MUP 0,32 μ M			
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 μ l 500 μ g/ml	t 15min (RFU)
Tira 1,1	50	138	134
Tira 1,2	60	146	142
Tira 1,3	52	139	134
Tira 2,1	42	132	129
Tira 2,2	48	130	127
Tira 2,3	46	137	135
Tira 3,1	42	123	121
Tira 3,2	47	128	126
Tira 3,3	44	123	122

10

Tabla 5b: resultados obtenidos para la solución B3 (CB-Co 6,4 μ M):

CB-Co 6,4 μ M			
	T0 (RFU) BKG	T 30sec (RFU)	t 15min (RFU)
Tira 1,1	56	55	55
Tira 2,1	65	65	64
Tira 3,1	73	72	71

Tabla 5c.: resultados obtenidos para la solución C3 (6,4 μ M CB-Co + 0,32 μ M 4-MUP):

15

CB-Co 6,4 μ M + 4-MUP 0,32 μ M			
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 μ l 500 μ g/ml	t 15min (RFU)
Tira 1,1	66	165	179
Tira 1,2	72	169	183
Tira 1,3	65	161	175
Tira 2,1	61	184	191
Tira 2,2	66	191	200
Tira 2,3	67	194	203
Tira 3,1	67	167	178
Tira 3,2	64	167	180
Tira 3,3	68	167	180

Tabla 5d: Valores relativos de fluorescencia (RFV) para el conjunto de las pruebas efectuadas a una concentración en 4-MUP de 0,32 μ M.

	Solución A3 (4-MUP)	Solución C3 (4-MUP + CB-Co)
	t 15 min - BKG	
	RFV	RFV
Tira 1,1	84	113
Tira 1,2	82	111
Tira 1,3	82	110
Tira 2,1	87	130
Tira 2,2	79	134
Tira 2,3	89	136
Tira 3,1	79	111
Tira 3,2	79	116
Tira 3,3	78	112

- 5 Tras estos diferentes experimentos, los valores medios RFV se calcularon para cada concentración de 4-MUP, para cada solución A1, A2, A3 y C1, C2 y C3.

Estos valores medios se recogen en la gráfica que aparece a la figura 10.

- 10 Como destaca de la figura 10, el aumento de la fluorescencia media entre las soluciones A (A1, A2, A3) y C (C1, C2, C3) es de aproximadamente el 50%. Este aumento de la fluorescencia se debe a la señal generada por el azul de calceína.

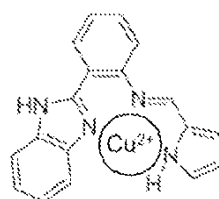
Ejemplo 5: Prueba preliminar de estabilidad:

- 15 La estabilidad del complejo CB-Co, del sustrato enzimático fluorogénico 4-MUP y de su mezcla se ensayó siguiendo su fluorescencia en el tiempo. Esto con el fin de verificar que se evita la hidrólisis espontánea del sustrato enzimático fluorogénico 4-MUP, así como el desplazamiento del catión Co^{2+} del azul de calceína (CB).

- 20 Los resultados obtenidos por la solicitante han permitido demostrar que no hay interacción espontánea y que la fluorescencia sigue estable en el tiempo (especialmente entre 0 y 25 minutos)

Ejemplo 6: Utilización del complejo N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)metiliden]amina - ion cobre (Cu^{2+}) a título de complejo quimiodetector-catión inactivado

- 25 El complejo N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)metiliden]amina asociado al ion cobre (Cu^{2+}), de fórmula (II) siguiente:

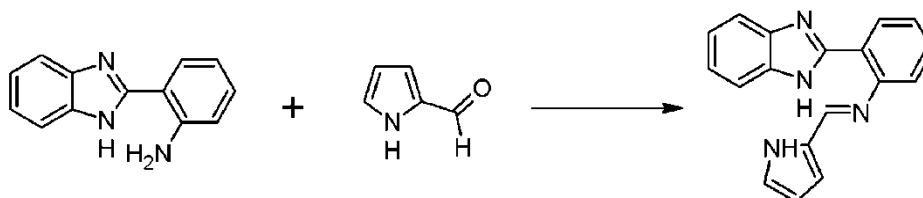


(II) ;

- 30 es otro ejemplo de complejo quimiodetector-catión que reacciona específicamente con el fosfato inorgánico Pi , que puede utilizarse como sustrato secundario.

1. Síntesis de la N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)-metiliden]amina:

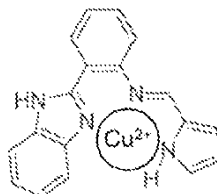
- 35 El compuesto N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)metiliden]amina se obtiene según la reacción siguiente:



Una solución de 2-(2-aminofenil)-1H-benzimidazol (209 mg, 1,0 mmol) se pone a reaccionar con pirrol-2-carboxaldehído (142 mg, 1,5 mmol) en 50 ml de metanol seco, y se calienta a reflujo durante 10 horas. Después de la reacción, el disolvente se evapora a 25 ml y se mantiene a 50°C para una evaporación lenta. El precipitado blanco obtenido se filtra y se lava después con metanol frío tres veces.

2. Síntesis del complejo quimiodetector-catión:

El complejo N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)-metiliden]amina asociado al ion cobre (Cu^{2+}), de fórmula (II) siguiente:



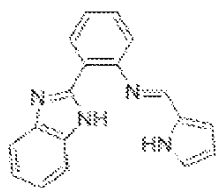
(II);

se obtiene haciendo reaccionar la N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)-metiliden]amina (286 mg, 1,0 mmol) con $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (295 mg, 1,0 mmol) en THF/ H_2O (30 ml, 1/1, v/v). La mezcla se calienta a reflujo durante 8 horas. Al final de la reacción, el producto se separa por difusión lenta de éter dietílico a la mezcla de reacción. El sólido se lava con metanol frío y se obtiene un producto de color verde oscuro.

3. Activación del complejo quimiodetector-catión inactivado:

Como se ilustra en la figura 7, este complejo quimiodetector-catión inactivado se activa por el fosfato inorgánico Pi y permite formar por un lado un producto no fluorescente que asocia el catión Cu^{2+} al ion hidrogenofosfato (Pi-Cu) y por otro lado liberar el compuesto fluorescente [2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)-metiliden]amina. La figura 11 compara el espectro de emisión de una composición que comprende el complejo quimiodetector-catión inactivado (N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)-metiliden]amina - ion cobre (Cu^{2+})) sin fosfato inorgánico Pi con el espectro de emisión de una composición que comprende al mismo tiempo el complejo quimiodetector-catión inactivado (N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)-metiliden]amina - ion cobre (Cu^{2+})) y el fosfato inorgánico Pi. Como se destaca de esta figura 11, la presencia del fosfato orgánico permite la formación por un lado del producto no fluorescente que asocia el catión Cu^{2+} al ion hidrogenofosfato (Pi-Cu), y por otro lado liberar el compuesto fluorescente [2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)-metiliden]amina.

El compuesto fluorescente así obtenido:



expuesto o excitado por una fuente luminosa de longitud de onda de aproximadamente 370 ± 5 nm emite unos rayos luminosos o señales de fluorescencia según una tercera longitud de onda de aproximadamente 425 ± 20 nm.

Así, el producto fluorescente se excita y emite a longitudes de ondas sustancialmente compatibles que la 4-metilumbeliferona (4-MU).

Este complejo quimiodetector-catión inactivado es también compatible con el pH del VIDAS XA que es de aproximadamente 9,2.

Referencias bibliográficas

- Alvaro M. *et al.*, 2001, Chem. Phys. Lett., 350: 240-246

- Henary M. M. *et al.*, 2004, Chem. Eur. J., 10: 3015-3025

- Jung H.S. *et al.*, 2009, J. Am. Chem. Soc., 131: 2008-2012

- Leong W. L. y Vittal J. J., 2007, Cryst. Growth Des, 7(10): 2112-2116
- Rassasie M.J. *et al.*, 1992, Steroids, 57: 112
- Saluja P. *et al.*, 2012, Tetrahedron Lett., 53: 3292-3295
- Stabler T.V., *et al.*, 1991, Clin. Chem., 37(11): 1987
- Thomas F. *et al.*, 1999, J. Biol. Chem., 274: 13375-13383
- Yao J. y al, 2009, Inorg. Chem Commun., 12: 116-118
- Zhang G. *et al.*, 2012, Sensor Actuat. B-Chem., 171-172: 786-794

REIVINDICACIONES

1. Composición para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia que comprende (i) un sustrato enzimático fluorogénico y (ii) un compuesto fluorogénico inactivado que forma un compuesto fluorescente después de la hidrólisis del sustrato enzimático fluorogénico (i).
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que el sustrato enzimático fluorogénico se selecciona entre el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP), el 4-metilumbeliferil galactósido (4-MUG), el 4-metilumbeliferil sulfato (4-MUS), la fluoresceína di-fosfato (FDP), el 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil fosfato (DiFMUP), el 9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetillacridin-2-one-7-il) fosfato (DDAO fosfato), el 2'-[2-benzotiazol]-6'-hidroxibenzotiazol fosfato, el 2-naftil fosfato y el 2-umbeliferil fosfato.
3. Composición según la reivindicación 2, caracterizada por que el sustrato enzimático fluorogénico es el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP).
4. Composición según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que el compuesto fluorogénico inactivado es un complejo quimiodetector-catión inactivado.
5. Composición según la reivindicación 4, caracterizada por que el quimiodetector del complejo quimiodetector-catión inactivado se selecciona entre las cumarinas hidrófilas y los derivados del bencimidazol, y por que el catión del complejo quimiodetector-catión inactivado se selecciona entre el Co^{2+} , el Cr^{3+} , el Cu^{2+} , el Fe^{2+} , el Fe^{3+} , el Mn^{2+} , el Ni^{2+} , el Hg^{2+} y el Pb^{2+} .
6. Composición según la reivindicación 5, caracterizada por que el complejo quimiodetector-catión inactivado se selecciona entre:
 - el complejo azul de calceína - ion Cobalt (Co^{2+}) et
 - el complejo N-[2-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-fenil]-N-[(E)-1-(1H-pirrol-2-il)metiliden]amina - ion cobre (Cu^{2+}).
7. Composición según la reivindicación 4, caracterizada por que el sustrato enzimático fluorogénico es el 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP) y por que el complejo quimiodetector-ion inactivado es el complejo azul de calceína - ion Cobalto (Co^{2+}).
8. Kit para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia que comprende una composición según una de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Dispositivo automatizado de inmuno-análisis que comprende una composición según una de las reivindicaciones 1 a 7 o un kit según la reivindicación 8.
10. Utilización de una composición, de un kit o de un dispositivo automatizado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia de un analito.
11. Procedimiento de detección y/o cuantificación *in vitro* de un analito por inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia de una muestra líquida de prueba susceptible de contener el analito, que comprende las etapas siguientes de:
 - poner en contacto un compañero de captura, previamente fijado o no fijado sobre una superficie sólida, y de dicha muestra líquida para la fijación del analito sobre el compañero de captura;
 - añadir un compañero de detección, el cual está acoplado directa o indirectamente a una enzima capaz de lisar el sustrato enzimático fluorogénico de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 7, para la fijación sobre el complejo compañero de captura-analito;
 - poner en contacto una composición según una de las reivindicaciones 1 a 7 y el complejo compañero de captura-analito-compañero de detección para la formación de un medio de reacción; y
 - detectar por inmunofluorescencia la presencia y/o la cantidad de analito midiendo la fluorescencia emitida en el medio de reacción.
12. Procedimiento de detección y/o cuantificación *in vitro* de un analito según la reivindicación 11, que comprende al menos una de las etapas siguientes:
 - antes de la adición del compañero de detección, una etapa de aclarado a fin de eliminar el analito no unido a complejo compañero de captura-analito; y

después de la adición del compañero de detección, una etapa de aclarado a fin de eliminar el compañero de detección no unida.

5 13. Procedimiento de detección y/o cuantificación *in vitro* de un analito por inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia de una muestra líquida de prueba susceptible de contener el analito, que comprende las etapas siguientes de:

10 - poner en contacto un compañero de captura, previamente fijado o no fijado sobre una superficie sólida, un análogo al analito acoplado a una enzima capaz de lisar el sustrato enzimático fluorogénico de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 7, y dicha muestra líquida, los cuales entran en competición para la fijación sobre el compañero de captura;

15 - poner en contacto una composición según una de las reivindicaciones 1 a 7 y los complejos compañero de captura-analito y compañero de captura-análogo al analito para la formación de un medio de reacción; y

- detectar por inmunofluorescencia la presencia y/o cantidad de analito midiendo la fluorescencia emitida en el medio de reacción.

20 14. Procedimiento de detección y/o cuantificación *in vitro* de un analito según la reivindicación 13, que comprende al menos una de las etapas siguientes:

antes de la adición del compañero de detección, una etapa de aclarado a fin de eliminar el analito no unido a complejo compañero de captura-analito; y

25 después de la adición del compañero de detección, una etapa de aclarado a fin de eliminar el compañero de detección no unida.

30 15. Procedimiento de mejora de la sensibilidad de un procedimiento de detección y/o cuantificación *in vitro* por inmunoensayo enzimático por inmunofluorescencia de un analito a detectar en una muestra de ensayo, caracterizado por que comprende la utilización, durante la realización del ensayo, de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o de un kit según la reivindicación 8.

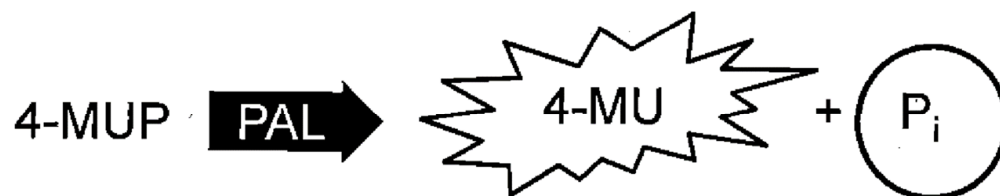


FIG. 1

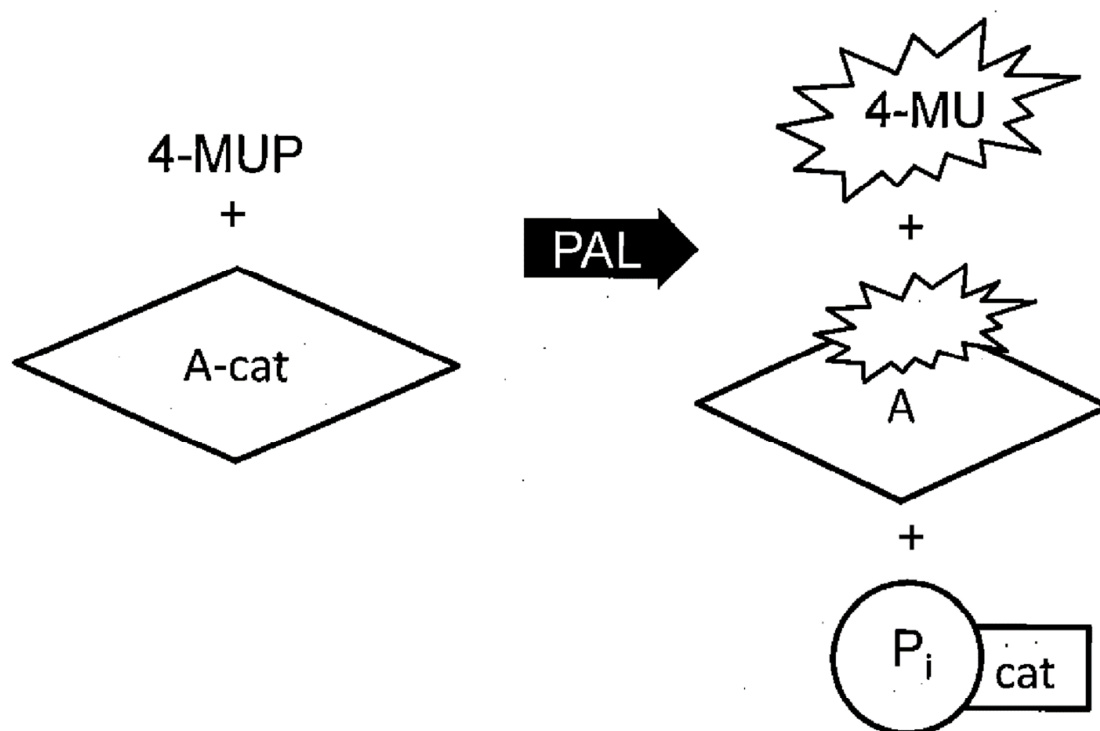


FIG. 2

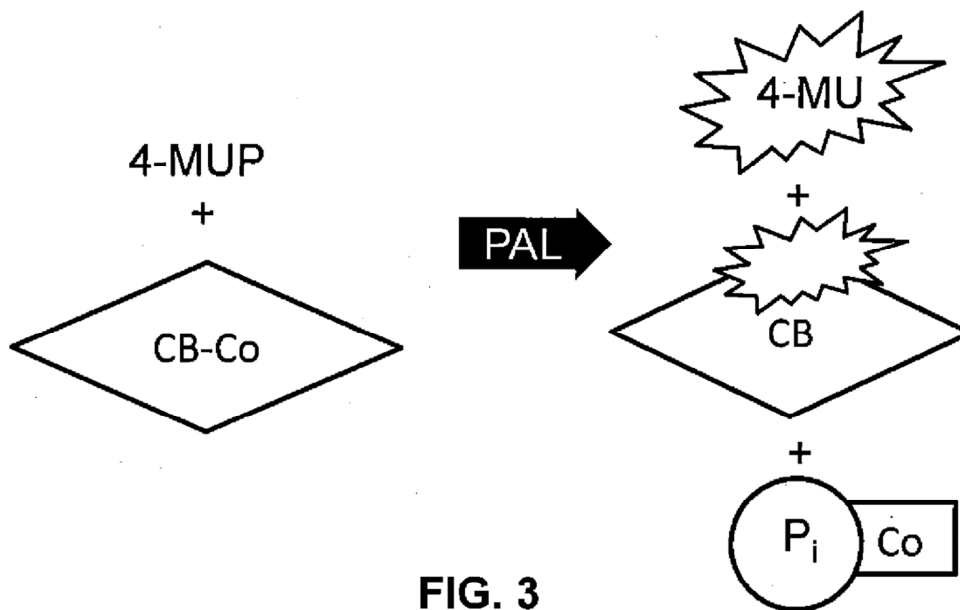


FIG. 3

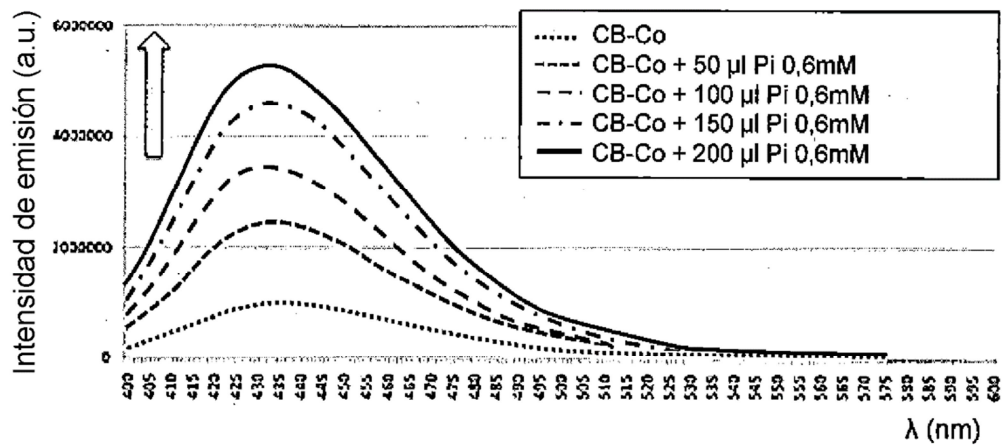


FIG. 4

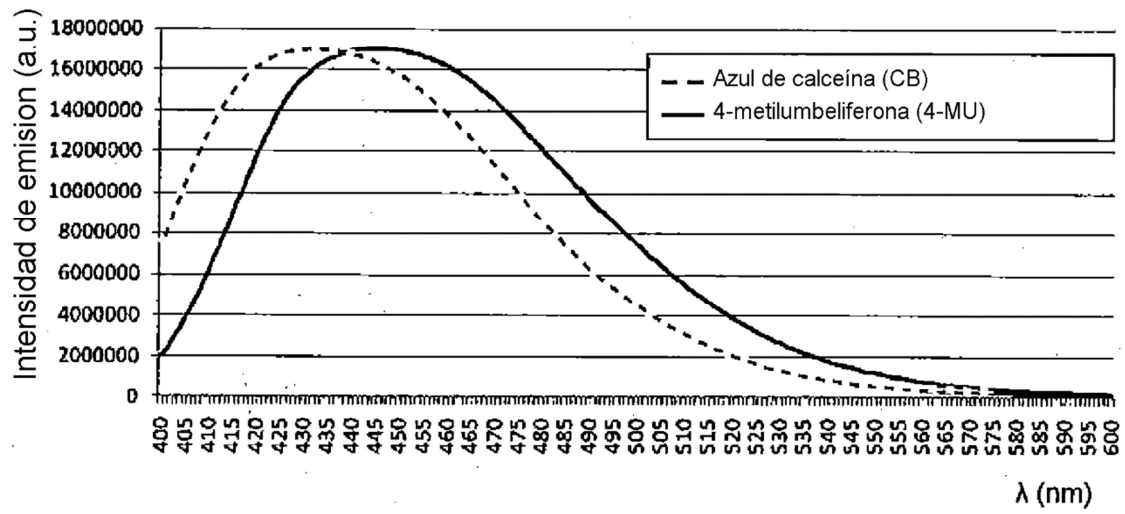


FIG. 5

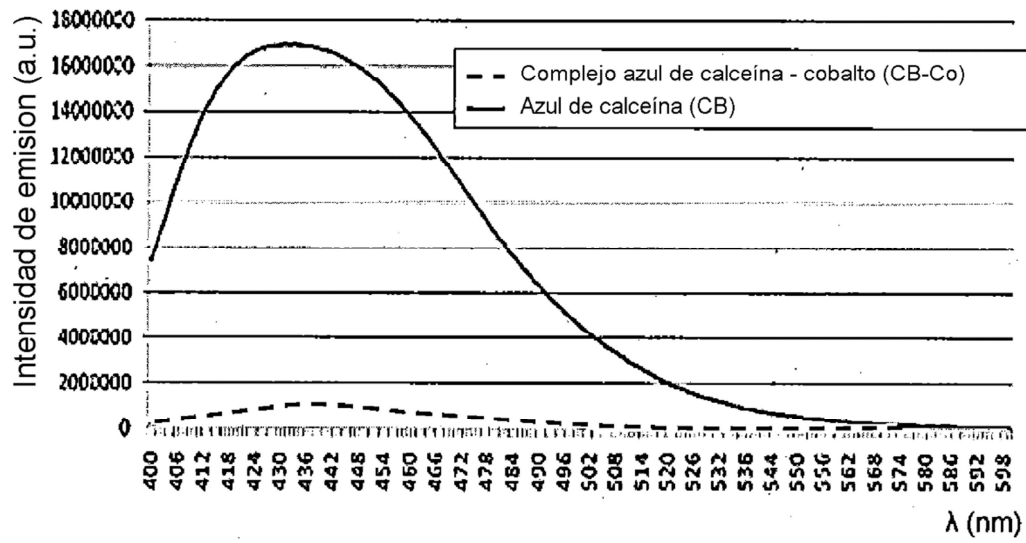
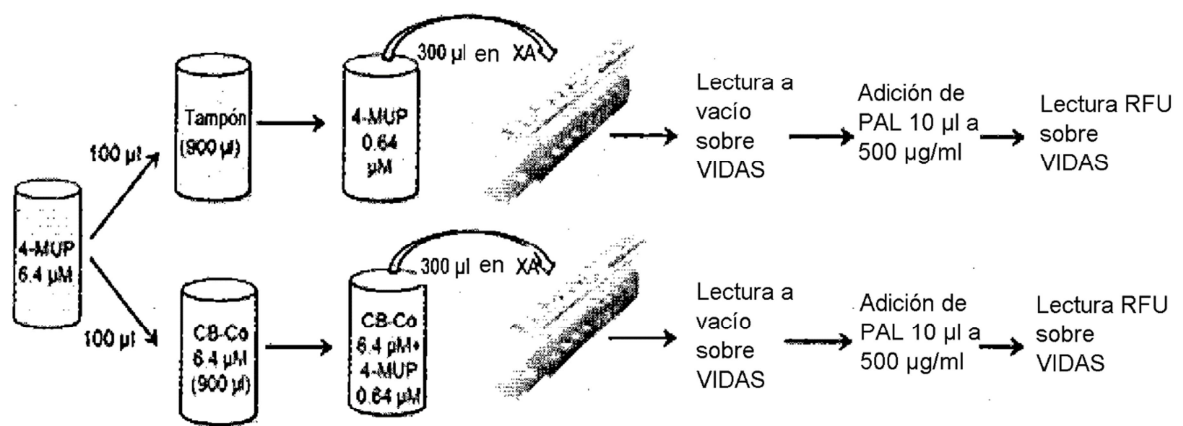
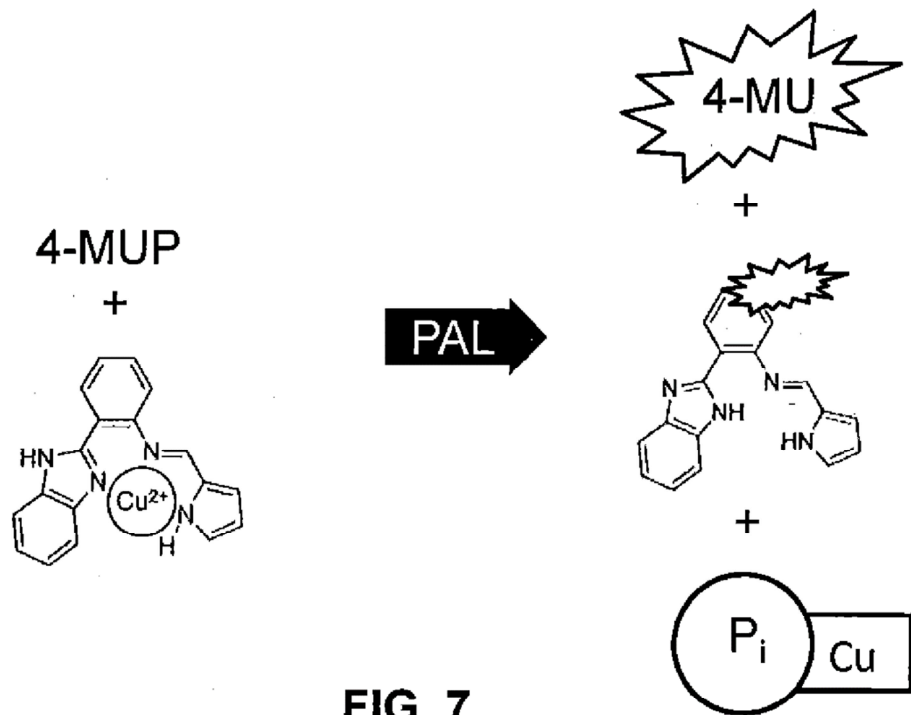


FIG. 6



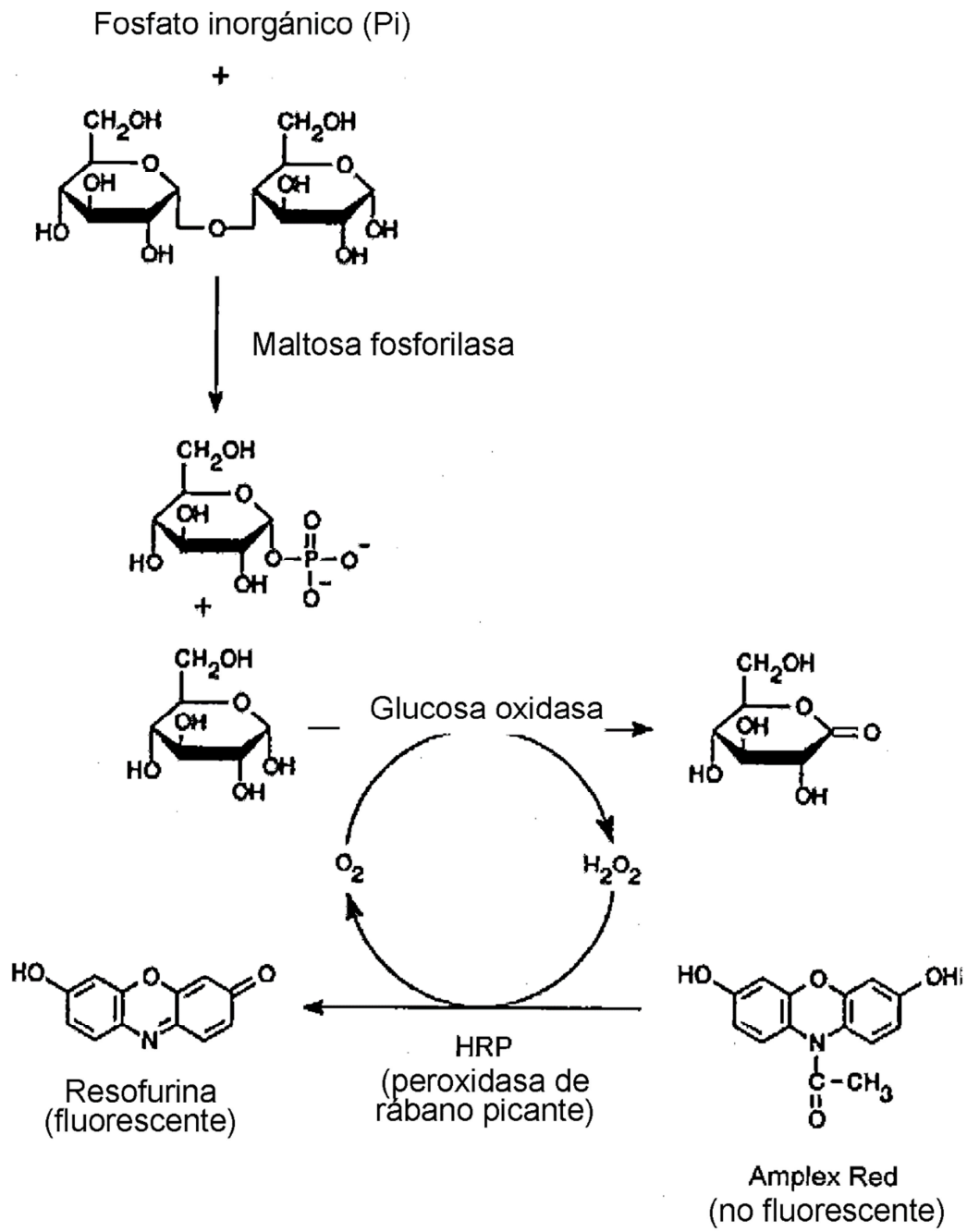


FIG. 9

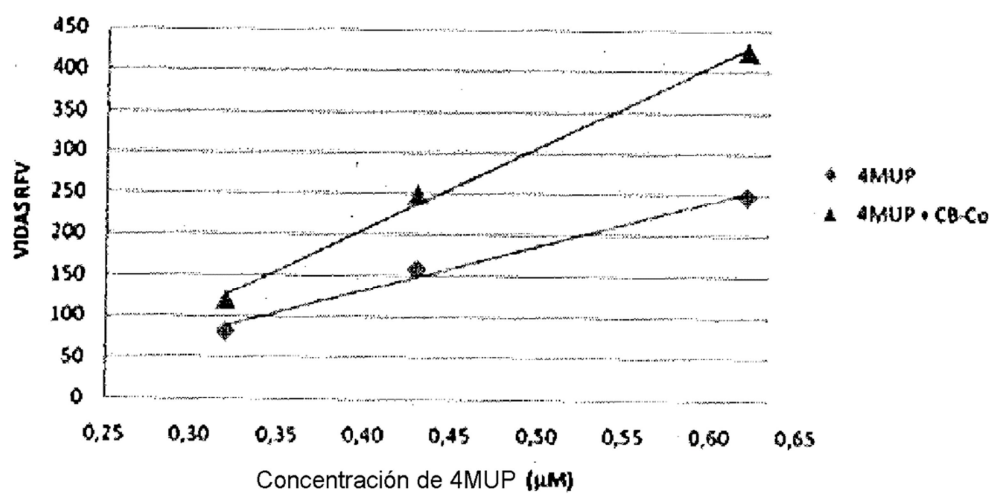


FIG. 10

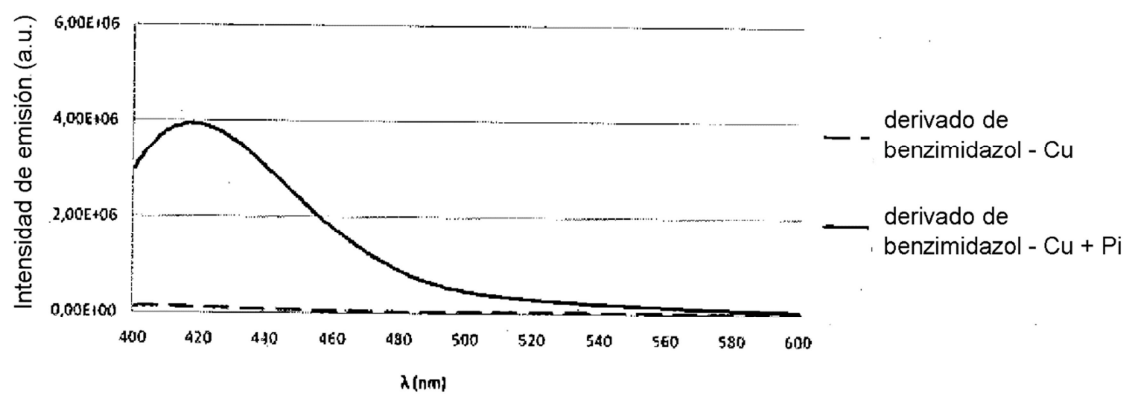


FIG. 11