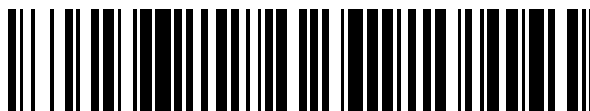


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 308**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2014 PCT/US2014/061489**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15061260**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2014 E 14856561 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3060917**

54 Título: **Ensayos de analitos macromoleculares**

30 Prioridad:

24.10.2013 US 201361894931 P

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

13.02.2020

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

DUFFY, JAMES E.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 742 308 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

Ensayos de analitos macromoleculares

Antecedentes

5 La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos útiles para determinar la presencia o ausencia de analitos, en particular, analitos macromoleculares.

10 El campo del diagnóstico clínico ha experimentado una amplia expansión a lo largo de los 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. Se desean medios convenientes, fiables y no peligrosos para detectar la presencia de bajas concentraciones de materiales en líquidos. En química clínica, estos materiales pueden estar presentes en fluidos corporales en concentraciones por debajo de 10^{-12} molar. La dificultad de detectar bajas concentraciones de estos materiales se ve aumentada por los tamaños de muestra relativamente pequeños que pueden utilizarse. Se conoce un inmunoensayo de reconocimiento dual para la detección de anticuerpos en una muestra con alta especificidad y sensibilidad (patente US 2010/0196878 A1). Además, la patente US 2009/0258435 A1 proporciona un método para diseñar un reactivo de anticuerpo para su uso en un ensayo para la detección de un analito para obtener una sensibilidad y/o intervalo dinámico del ensayo óptimos.

15 Enfermedades como, por ejemplo, una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmune, se manifiestan en la formación de un anticuerpo contra un antígeno específico que es característico de la enfermedad y que se encuentra en la sangre de un paciente. Por lo tanto, en la detección de dichas enfermedades es importante detectar la presencia y/o cantidad del anticuerpo contra un antígeno específico característico de dicha enfermedad. Por ejemplo, la patente EP 0 351 248 A2 y el documento WO 01/27621 A2 están dirigidos a un método de inmunoensayo para la detección o medición de sustratos en fluidos biológicos como la sangre, el suero o el plasma. Las muestras como la sangre, por ejemplo, el suero, normalmente tienen una gran cantidad de anticuerpos presentes en la muestra. Se conocen métodos para la detección de anticuerpos contra antígenos específicos. Dichos métodos implican la unión, covalente o no covalente, de todos los anticuerpos en una muestra con un reactivo y a continuación identificar, de todos los anticuerpos unidos, el anticuerpo contra el antígeno específico. Como resultado, se debe usar una gran cantidad de este reactivo porque la mayoría del reactivo se une a los anticuerpos que no están dirigidos al antígeno específico de interés. Los ejemplos de dichos enfoques incluyen poner en contacto una muestra humana con una IgG de mamífero biotinilada dirigida contra humano que reconoce y se une no covalentemente a todos los anticuerpos humanos en la muestra. En otro ejemplo, todos los anticuerpos en una muestra se biotinilan a través de la unión covalente de la biotina a los anticuerpos.

20 Existe la necesidad de un ensayo para un analito macromolecular como un anticuerpo que no utilice un reactivo que se una a todas las sustancias macromoleculares en una muestra. El ensayo debe minimizar el número de reactivos necesarios para medir el analito macromolecular de interés que está presente en una muestra.

Sumario

35 El objeto de la presente invención es un método para determinar un analito macromolecular en una muestra sospechosa de contener el analito macromolecular. El método comprende combinar en un medio la muestra y un reactivo conjugado que comprende una molécula pequeña y un compañero de unión del analito macromolecular, combinar el reactivo conjugado y un compañero de unión marcado de la molécula pequeña, y examinar el reactivo conjugado o el medio para una cantidad de compañero de unión marcado de la molécula pequeña que se une a la molécula pequeña y relaciona la su cantidad con la cantidad del analito macromolecular en la muestra. El analito macromolecular, cuando está presente, se une al compañero de unión del analito macromolecular. Tiene un tamaño o una forma o una combinación de tamaño y forma que dificulta la capacidad del compañero de unión para que la molécula pequeña se una a la molécula pequeña cuando la molécula pequeña es parte del reactivo que también comprende el compañero de unión que es específico para la sustancia macromolecular. El analito macromolecular tiene un peso molecular de al menos 5000 y se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, enzimas, hormonas, polinucleótidos y carbohidratos. La molécula pequeña es una molécula orgánica que tiene un peso molecular en el intervalo de 100 a 2000, comprende grupos funcionales que son reactivos con el compañero de unión del analito macromolecular y está unida al compañero de unión del analito macromolecular. Preferiblemente, el reactivo conjugado comprende además un soporte al que se unen la molécula pequeña y el compañero de unión del analito macromolecular.

40 En el método, el analito macromolecular es preferiblemente un analito de anticuerpos, el compañero de unión del analito macromolecular es un antígeno que se une al analito de anticuerpos, y la molécula pequeña y la molécula pequeña y el antígeno que se une al analito de anticuerpos se unen a un soporte, comprendiendo además el método: incubar el medio en condiciones para la unión del compañero de unión marcado a la molécula pequeña, y examinar el soporte o el medio para una cantidad de compañero de unión marcado de la molécula pequeña unida a

la molécula pequeña y relacionar su cantidad con la cantidad del analito de anticuerpo en la muestra.

La molécula pequeña se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en biotina, destiobiotina, dinitrofenol, digoxina, digoxigenina, rodamina y fluoresceína. El marcador del compañero de unión marcado se selecciona del grupo que consiste en enzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, electroluminiscentes, sensibilizadores y materiales radioactivos. La muestra puede ser una excreción corporal, una aspiración corporal, una extirpación corporal o un extracto corporal. El método es preferiblemente un método de ensayo homogéneo. El soporte es, por ejemplo, una partícula no magnética, una partícula magnética, una placa o un tubo. El soporte puede comprender un marcador que es interactivo con el marcador del compañero de unión marcado. Preferiblemente, en el método, la molécula pequeña y el antígeno que se une al analito del anticuerpo se unen a una partícula, el método comprendiendo además: incubar el medio en condiciones para la unión del compañero de unión marcado a la molécula pequeña, y examinar el soporte o el medio para una cantidad de compañero de unión marcado unida a la molécula pequeña y relacionar la su cantidad con la cantidad del analito de anticuerpo en el muestra. El compañero de unión marcado está marcado preferiblemente con una partícula que comprende un marcador sensibilizador y la partícula que tiene unida a la misma una molécula pequeña comprende un marcador quimioluminiscente. La partícula que tiene unida a ella una molécula pequeña es preferiblemente una partícula magnética. En una realización preferida, la molécula pequeña está unida al antígeno, que está unido a la partícula.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra una comparación de diferentes reactivos biotinilados utilizados para llevar a cabo un método de acuerdo con un ejemplo de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. La Figura 2 es un gráfico que muestra una gráfica de uno de los reactivos biotinilados de la Figura 1 utilizado en la realización de un método de acuerdo con un ejemplo de acuerdo con los principios descritos en este documento.

Descripción detallada de realizaciones específicas

Los ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento proporcionan un formato simple para un ensayo para un analito macromolecular tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano, que evita el desafío de seleccionar el analito macromolecular de interés de todas las múltiples sustancias macromoleculares presentes en muestra de paciente. Los ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento eliminan la necesidad de una unión covalente o no covalente de un reactivo a esencialmente todas las sustancias macromoleculares presentes en la muestra para evaluar un analito macromolecular de interés. Se evita el uso de un reactivo de este tipo junto con su coste asociado y posibles problemas de interferencia.

En los ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, se emplea un sistema de reactivos en el que los reactivos no incluyen un reactivo que se une de forma covalente o no covalente a esencialmente a todas las sustancias macromoleculares presentes en una muestra. Por lo tanto, el sistema de reactivos está esencialmente libre de un reactivo que se une de forma covalente o no covalente a esencialmente todas las sustancias macromoleculares en una muestra. Los ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento utilizan un sistema de reactivos en el que la única interacción de un analito macromolecular es con un compañero de unión específico para el analito macromolecular. Por ejemplo, para un analito de anticuerpos, la única interacción del analito de anticuerpos es una interacción anticuerpo-antígeno en la que el anticuerpo objetivo de una muestra reconoce un antígeno específico empleado en un sistema de reactivos de acuerdo con los principios descritos en este documento. En algunos ejemplos, el antígeno específico puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. A través de la atracción del anticuerpo de muestra al antígeno específico, el anticuerpo bloqueará físicamente o impedirá estéricamente la disponibilidad de una molécula pequeña a un compañero de unión de la molécula pequeña, que puede estar marcado o se puede marcar (es decir, comprende un resto que se une a un marcador como, por ejemplo, un miembro de un par de unión específico). En algunos enfoques de acuerdo con los principios descritos en este documento, una muestra de nivel cero sin anticuerpo tendrá una alta señal de generación, y cantidades crecientes de anticuerpos en la muestra reducirán progresivamente la cantidad de señal generada a partir del marcador.

El término "analito" se refiere a un componente de interés; el compuesto o composición a detectar. El analito es un miembro de un par de unión específico.

El término "analito(s) macromolecular(es)" se refiere a una sustancia que tiene un tamaño o una forma o una combinación de tamaño y forma que dificulta la capacidad de un compañero de unión para que una molécula pequeña se una a la molécula pequeña cuando la molécula pequeña es parte de un reactivo que también comprende un compañero de unión (por ejemplo, material antigénico) que es específico para la sustancia macromolecular. Los analitos macromoleculares son moléculas poliméricas que tienen un peso molecular (peso molecular promedio en peso) de al menos 5000, o al menos aproximadamente 10.000, o al menos aproximadamente 50.000, o al menos aproximadamente 100.000, o al menos aproximadamente 500.000, o al menos aproximadamente 1.000.000, por ejemplo. El peso molecular puede estar en un intervalo de 5.000 a

aproximadamente 10.000.000 o más, o de 10.000 a aproximadamente 10.000.000 o más, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 8.000.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 6.000.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 5.000.000 o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 4.000.000 o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 3.000.000 o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 2.000.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.000.000, o de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 10.000.000 o más, o de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 8.000.000, o de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 6.000.000, o de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 5.000.000 o de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 4.000.000, o de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 3.000.000 o de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 2.000.000, o de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 1.000.000, o de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 10.000.000 o más, o de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 8.000.000, o de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 6.000.000 o de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 5.000.000 o de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 4.000.000, o de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 3.000.000 o de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 2.000.000, o de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1.000.000, por ejemplo.

Los analitos macromoleculares pueden ser, por ejemplo, poli (aminoácidos), es decir, polipéptidos y proteínas; carbohidratos, por ejemplo, polisacáridos; o ácidos nucleicos; y combinaciones de los mismos. Dichas combinaciones incluyen, pero no se limitan a, componentes de bacterias, virus, cromosomas, genes, mitocondrias, núcleos y membranas celulares, por ejemplo. En la categoría de poli (aminoácidos), los poli (aminoácidos) de interés tienen un peso molecular de 5000 a 5.000.000, o un peso molecular de aproximadamente 20.000 a 1.000.000; entre las hormonas de interés, los pesos moleculares generalmente oscilarán entre 5000 y 60.000 de peso molecular. Los analitos macromoleculares se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos, enzimas, hormonas, polinucleótidos y carbohidratos.

Una amplia variedad de proteínas están incluidas dentro del término poli (aminoácidos). Dichas proteínas incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas, citoquinas, enzimas, hormonas, antígenos del cáncer, marcadores nutricionales, antígenos específicos de tejidos, por ejemplo. Dichas proteínas incluyen, a título ilustrativo y no limitante, protaminas, histonas, albúminas, globulinas, escleroproteínas, fosfoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, glicoproteínas, receptores de células T, proteoglicanos, HLA, proteínas no clasificadas, por ejemplo, somatotropina, prolactina, insulina, pepsina, proteínas que se encuentran en el plasma humano, factores de coagulación de la sangre, hormonas proteicas como, por ejemplo, hormona estimulante folicular, hormona luteinizante, luteotropina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormonas de tejidos, citoquinas, antígenos del cáncer como, por ejemplo, PSA, CEA, α -fetoproteína, fosfatasa ácida, CA19. 9 y CA125, antígenos específicos de tejido, tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina, mioglobina, CPK-MB y calcitonina, y hormonas peptídicas. Otros materiales poliméricos de interés son los mucopolisacáridos y los polisacáridos.

Para los analitos de inmunoglobulina, los pesos moleculares varían de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 2×10^8 , o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 10^6 . Para las inmunoglobulinas, IgA, IgG, IgE e IgM, los pesos moleculares varían de aproximadamente 160.000 a aproximadamente 10^6 . Los pesos moleculares de las enzimas están en el intervalo de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.000.000. Los receptores naturales varían ampliamente, y en general tienen un peso molecular de al menos aproximadamente 25.000 y pueden tener un peso molecular de aproximadamente 10^6 o superior, incluidos materiales como la avidina, el ADN, el ARN, la globulina de unión a la tiroxina, la prealbúmina de unión a la tiroxina y la transcortina, por ejemplo. El término analito macromolecular incluye además analitos polinucleotídicos, tales como m-ARN, r-ARN, t-ARN, ADN y dúplex de ADN-ARN, por ejemplo.

La muestra a analizar puede ser biológica o no biológica. Las "muestras no biológicas" son aquellas que no se relacionan con un material biológico e incluyen, por ejemplo, muestras de suelo, muestras de agua, muestras de aire, muestras de otros gases y muestras de minerales. La frase "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico como, por ejemplo, fluido corporal, tejido corporal, compuestos corporales y medios de cultivo. La muestra puede ser un sólido, semisólido o un fluido (un líquido o un gas) de cualquier fuente. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una excreción corporal, una aspiración corporal, una extirpación corporal o un extracto corporal. El cuerpo puede ser, por ejemplo, de mamíferos, reptiles, peces, plantas, hongos o bacterias. En algunos ejemplos, la muestra es la de un mamífero y en algunas realizaciones, el cuerpo es un cuerpo humano.

Las excreciones corporales son aquellas sustancias que se excretan de un cuerpo (aunque también pueden obtenerse por escisión o extracción) como, por ejemplo, orina, heces, deposiciones, mucosidad vaginal, semen, lágrimas, aliento, sudor, líquido de ampollas y exudados inflamatorio. Las extirpaciones corporales son aquellos materiales que se extraen de un cuerpo como, por ejemplo, muestras de piel, cabello y tejidos, incluidas biopsias de órganos y otras partes del cuerpo. Las aspiraciones corporales son aquellos materiales que se aspiran de un cuerpo como, por ejemplo, saliva y esputo. Los extractos corporales son aquellos materiales que se extraen de un cuerpo como, por ejemplo, sangre entera, plasma, suero, líquido espinal, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático, líquido sinovial y líquido peritoneal.

El reactivo empleado en la determinación de un analito macromolecular comprende un conjugado de una molécula pequeña y un compañero de unión del analito macromolecular. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, un reactivo empleado en la determinación de un analito macromolecular comprende un soporte que tiene unido al mismo una molécula pequeña y un compañero de unión del analito macromolecular, que puede unirse individualmente al soporte o se puede unir como un conjugado de la molécula pequeña y un compañero de unión del analito macromolecular.

El soporte puede ser sólido o semisólido y puede comprender un material orgánico o inorgánico, insoluble en agua, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte sólido puede tener cualquiera de varias formas tales como, por ejemplo, partículas, incluyendo esferas y partículas, película, membrana, tubo que incluye fibra hueca, pocillo, tira, varilla y superficies planas como, por ejemplo, placa. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte sólido puede o puede 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 y partículas magnéticas. Otras composiciones sólidas de soporte incluyen polímeros, tales como poli (cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli-(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli (etilentereftalato), nailon, y poli (vinil butirato), por ejemplo; ya se usen por sí mismos o junto con otros materiales.

En algunas realizaciones, el soporte es una partícula. Las partículas generalmente tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 100 micrómetros, o aproximadamente de 0,05 a aproximadamente 100 micrómetros, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 micrómetros, o de aproximadamente de 0,5 a aproximadamente 100 micrómetros, o de aproximadamente de 0,02 a aproximadamente 50 micrómetros, o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 50 micrómetros, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 micrómetros, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 micrómetros, o de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 20 micrómetros, o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 20 micrómetros, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 micrómetros, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 micrómetros, por ejemplo. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0,05 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros o de aproximadamente 0,3 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros, o de aproximadamente 0,3 micrómetros a aproximadamente 5 micrómetros, por ejemplo. En algunas realizaciones, las partículas son partículas de látex o partículas magnéticas, por ejemplo, partículas de cromo.

La molécula pequeña es una molécula orgánica que tiene un peso molecular por debajo de 2000, o por debajo de aproximadamente 1500, o por debajo de aproximadamente 1000, o por debajo de aproximadamente 500, o por debajo de aproximadamente 400, o por debajo de aproximadamente 300, por ejemplo. En algunos ejemplos, la molécula pequeña tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 100 a 2000, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1500, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 500, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 400, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 300, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 200, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 2000, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 1500, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 500, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 400, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 300, por ejemplo. Los ejemplos del compañero de unión a moléculas pequeñas para los pares de moléculas pequeñas, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen el compañero de unión a biotina para la biotina (por ejemplo, avidina, estreptavidina, o anticuerpo para biotina), compañero de unión a destiobiotina para destiobiotina (por ejemplo, avidina, estreptavidina o anticuerpo para destiobiotina), compañero de unión a digoxina para digoxina (por ejemplo, anticuerpo para digoxina, etc.), compañero de unión a fluoresceína para fluoresceína (anticuerpo para fluoresceína, etc.), compañero de unión a rodamina para rodamina (por ejemplo, anticuerpo para rodamina) y compañero de unión a péptido para el péptido (anticuerpo para el péptido, etc.), por ejemplo.

La frase "compañero de unión" se refiere a una molécula que es miembro de un par de unión específico. Un miembro de un par de unión específico es una de las dos moléculas diferentes que tienen un área sobre la superficie o en una cavidad, que se une específicamente y por lo tanto se define como complementario con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específico pueden ser miembros de un par inmunológico, como antígeno-anticuerpo o hapteno-anticuerpo, biotina-avidina, hormonas-receptores de hormonas, enzima-sustrato, dúplex de ácidos nucleicos, IgG-proteína A, y pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN, por ejemplo.

El compañero de unión de la molécula pequeña puede estar unida, covalente o no covalentemente, a un marcador para formar un compañero de unión marcado de la molécula pequeña o a un resto al que puede unirse el marcador. El marcador puede ser cualquier molécula que esté involucrada directa o indirectamente en la generación de una señal en el ensayo que corresponda a la presencia del analito en una muestra. El marcador es parte de un sistema de producción de señales, que puede tener uno o más componentes, con al menos un componente que es el marcador. El sistema de producción de señales genera una señal que se relaciona con la presencia de un analito en una muestra. El sistema de producción de señales incluye todos los reactivos necesarios para producir una señal medible. Otros componentes del sistema de producción de señales incluyen, entre otros, sustratos, potenciadores,

activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, captadores, iones metálicos, sustancias de unión específica requeridas para la unión de sustancias que generan señales, por ejemplo. Otros componentes del sistema de producción de señales pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, por ejemplo.

5 El marcador puede detectarse directamente o es detectable indirectamente a través de, por ejemplo, una reacción de unión específica que une el marcador a un resto que comprende un componente generador de señal que produce una señal detectable. El marcador puede ser isotópico o no isotópico, y puede ser, a modo de ilustración y sin limitación, un polinucleótido que codifica un catalizador, un promotor, un colorante, una molécula fluorescente, una molécula quimioluminiscente, un sensibilizador que incluye fotosensibilizadores, una enzima, una coenzima, un sustrato enzimático, un resto radioactivo, una molécula orgánica pequeña, una secuencia de polinucleótidos amplificable, un soporte tal como, por ejemplo, una partícula tal como, por ejemplo, una partícula de látex o carbono, un sol metálico, una cristalita, un liposoma, una célula, una placa de microtitulación, por ejemplo. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, el marcador del compañero de unión marcado se selecciona del grupo que consiste en enzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, sensibilizadores, bioluminiscentes, electroluminiscentes y restos radioactivos.

El soporte comprende además un compañero de unión del analito macromolecular, cuya naturaleza depende de la naturaleza del analito macromolecular. Por ejemplo, para un analito macromolecular que es un anticuerpo, el compañero de unión para el anticuerpo puede ser un antígeno que se une específicamente al anticuerpo, es decir, un antígeno específico para el analito de anticuerpo. Para un analito macromolecular que es una enzima, el compañero de unión para la enzima puede ser un sustrato para la enzima. Para un analito macromolecular que es un polinucleótido, el compañero de unión para el polinucleótido puede ser un segundo polinucleótido que es complementario al primer polinucleótido.

La molécula pequeña y el compañero de unión del analito macromolecular pueden asociarse cada uno individualmente con el soporte o la molécula pequeña se puede unir al compañero de unión del analito macromolecular, que está asociado con el soporte. La forma de asociación de la molécula pequeña y/o el compañero de unión del analito macromolecular con un soporte depende de una o más de la naturaleza del soporte, la naturaleza de la molécula pequeña y el compañero de unión del analito macromolecular, la superficie específica y la porosidad del soporte y la naturaleza de cualquier disolvente empleado, por ejemplo. La asociación puede ser por adsorción de la molécula pequeña y/o el compañero de unión del analito macromolecular por el soporte, la unión covalente de la molécula pequeña y/o el compañero de unión del analito macromolecular al soporte, la unión no covalente de la molécula pequeña y/o el compañero de unión del analito macromolecular al soporte por medio de miembros de pares de unión (por ejemplo, avidina-biotina y digoxina-anticuerpo para digoxina), por ejemplo. De esta manera, la molécula pequeña y/o el compañero de unión del analito macromolecular se "asocia con" el soporte sólido.

Para la unión de la molécula pequeña a un compañero de unión para que el analito macromolecular forme un reactivo conjugado o para la unión covalente de una molécula pequeña y/o un compañero de unión del analito macromolecular a un soporte, puede emplearse una funcionalidad reactiva o un grupo funcional en uno o más de la molécula pequeña, el compañero de unión del analito macromolecular y el soporte para unir la molécula pequeña y/o el compañero de unión del analito macromolecular entre sí y/o al soporte. Los grupos funcionales en la molécula pequeña y/o el compañero de unión del analito macromolecular pueden estar presentes de forma natural o pueden introducirse sintéticamente y se discuten más detalladamente a continuación. El término "conjugado" se refiere a un compuesto formado por la unión covalente de dos o más compuestos químicos.

La naturaleza de los grupos funcionales empleados depende de una o más de la naturaleza del soporte, la naturaleza del grupo funcional en una molécula pequeña y/o el compañero de unión del analito macromolecular, la naturaleza de cualquier recubrimiento como, por ejemplo, un polisacárido en el soporte, y la flexibilidad en la incorporación de grupos funcionales en el soporte, por ejemplo. Los grupos funcionales pueden estar presentes de forma natural o pueden introducirse sintéticamente mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica. El término "grupo funcional" se refiere a una funcionalidad que puede reaccionar con una funcionalidad reactiva correspondiente en otra molécula para formar un enlace covalente. Dichas funcionalidades reactivas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, aldehído, carboxi, amino, imino, sulfhidrilo e hidroxilo, por ejemplo. Están disponibles un gran número de grupos funcionales adecuados para unirse a grupos amino (grupos funcionales reactivos amina), grupos carboxi (grupos funcionales reactivos carboxi), sulfhidrilos (grupos funcionales reactivos sulfhidrilo) y alcoholes (grupos funcionales reactivos alcohol), por ejemplo. Dichos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, ésteres activados que incluyen, por ejemplo, ésteres carboxílicos, ésteres imídicos, ésteres sulfónicos y ésteres de fosfato; nitritos activados; aldehídos; cetonas; maleimidias; haloalquilamidas; y agentes alquilantes, por ejemplo.

En algunos ejemplos, los grupos funcionales están presentes en el soporte y/o en la molécula pequeña y/o el compañero de unión del analito macromolecular por medio de un grupo de unión, que puede comprender una cadena de 1 a aproximadamente 60 átomos o más, o de 1 a aproximadamente 50 átomos, o de 1 a

aproximadamente 40 átomos, o de 1 a 30 átomos, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 o más átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 átomos, o de aproximadamente 5 a 30 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos, cada uno seleccionado independientemente del grupo que normalmente consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno, y fósforo, generalmente carbono y oxígeno. El número de heteroátomos en el grupo de unión puede variar de aproximadamente 0 a aproximadamente 8, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4, e incluyen heteroátomos que pueden estar presentes en un grupo funcional en el grupo de unión. Los átomos del grupo de unión pueden estar sustituidos con otros átomos distintos al hidrógeno, como por ejemplo uno o más de carbono, oxígeno y nitrógeno en forma de, por ejemplo, grupos alquilo, arilo, aralquilo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi o aralcoxi. Como regla general, la longitud de un grupo de unión particular puede seleccionarse arbitrariamente para proporcionar la conveniencia de la síntesis con la condición de que haya una interferencia mínima causada por el grupo de unión con la capacidad de las moléculas unidas para realizar su función particular, como por ejemplo, su función en un ensayo. El grupo de unión puede ser alifático o aromático. Cuando hay heteroátomos, el oxígeno normalmente estará presente como oxi u oxo, unido a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo; el azufre estará presente como tioéter o tiono; el nitrógeno normalmente estará presente como nitro, nitroso o amino, normalmente unido a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el fósforo se unirá al carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, generalmente como fosfonato y mono o diéster fosfato. Las funcionalidades presentes en el grupo de unión pueden incluir ésteres, tioésteres, amidas, tioamidas, éteres, ureas, tioureas, guanidinas, grupos azo, tioéteres, carboxilato, etc. El grupo de unión también puede ser una macro-molécula tal como poliéteres, polisacáridos, péptidos, proteínas, nucleótidos y dendrímeros.

Como se ha mencionado anteriormente, una molécula pequeña se une al compañero de unión para que el analito macromolecular forme un conjugado en lugar de unirse directamente al soporte. La molécula pequeña y el compañero de unión del analito macromolecular cada una pueden contener una funcionalidad que son reactivas entre sí. Dichas funcionalidades incluyen las mencionadas anteriormente para unir la molécula pequeña y/o el compañero de unión del analito macromolecular a un soporte.

En el método de determinación de un analito macromolecular en una muestra sospechosa de contener el analito macromolecular, la muestra y un reactivo conjugado que comprende una molécula pequeña y un compañero de unión del analito macromolecular, que puede o puede no estar unido a un soporte, se combinan en un medio, que puede ser un medio de ensayo. En algunos ejemplos, el medio de ensayo es un medio acuoso tamponado que tiene un pH moderado. El medio acuoso puede ser exclusivamente agua o puede incluir del 0,1 a aproximadamente el 40 por ciento en volumen de un codisolvente tal como, por ejemplo, un disolvente orgánico miscible con agua, por ejemplo, un alcohol, un éter o una amida. El pH para el medio generalmente estará en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5, por ejemplo. El pH utilizado a menudo es el resultado de un compromiso entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específico y el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, como los miembros del sistema de producción de señales, por ejemplo. Se pueden usar varios tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los tampones ilustrativos incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, borato, fosfato, carbonato, Tris (tris (hidroximetil)-aminometano), barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS y BICINE, por ejemplo. El tampón particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro tampón.

Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en el medio de ensayo. Por ejemplo, además de los tampones, el medio puede comprender uno o más estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados y sales para aumentar la fuerza iónica, por ejemplo. En algunos ejemplos, además de estos aditivos, el medio puede incluir proteínas tales como, por ejemplo, albúminas; disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como, por ejemplo, sulfato de dextrano; potenciadores de la unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; polisacáridos tales como, por ejemplo, dextrano, trehalosa o similares. El medio también puede comprender agentes para prevenir la formación de coágulos de sangre. Dichos agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, EDTA, EGTA, citrato y heparina. 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 y estreptomycin. Cualquiera de los materiales anteriores, si se emplea, está presente en una concentración o cantidad suficiente para lograr el efecto o función deseada.

El reactivo conjugado y el compañero de unión marcado de la molécula pequeña se combinan. En algunos ejemplos, la muestra, el reactivo conjugado y el compañero de unión marcado de la molécula pequeña se combinan secuencialmente y, en algunos ejemplos, la muestra, el reactivo conjugado y el compañero de unión marcado se combinan de manera esencialmente simultánea. En algunos ejemplos, el orden de adición más simple es añadir todos los materiales simultáneamente y examinar el medio o el reactivo conjugado para una cantidad de señal como en un ensayo homogéneo. Alternativamente, como se ha mencionado anteriormente, los reactivos se pueden combinar secuencialmente.

5 Cuando los reactivos anteriores se combinan secuencialmente, se pueden emplear uno o más periodos de incubación entre las etapas de combinación. Por lo tanto, se pueden aplicar uno o más periodos de incubación al medio en uno o más intervalos, incluidos los intervalos entre las adiciones de varios reactivos para determinar el analito macromolecular. La naturaleza de los periodos de incubación (por ejemplo, la duración y la temperatura) depende de la naturaleza de un método de ensayo particular empleado en las presentes determinaciones. En muchas realizaciones, el medio se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de los compañeros de unión y para que se produzca la unión y reacción de otros reactivos. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método. Las temperaturas de incubación pueden variar de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo. El periodo de tiempo para una incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos, por ejemplo. El periodo 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.

20 Después de la combinación del reactivo conjugado y el compañero de unión marcado de la molécula pequeña, se examina el reactivo conjugado o el medio para determinar la cantidad de compañero de unión marcado unida a la molécula pequeña. En algunos ejemplos, el reactivo o el medio se examinan en busca de una cantidad de señal procedente del marcador del compañero de unión marcado de la molécula pequeña. Cuando se examina el medio en busca de una cantidad de señal procedente del marcador, se puede emplear una cantidad conocida y controlada del compañero de unión marcado de la molécula pequeña, que exceda la cantidad máxima de analito macromolecular que se espera que esté presente en una muestra. En cualquiera de los dos enfoques, la medición de la cantidad de señal procedente del marcador permite medir una cantidad de analito macromolecular en la muestra.

25 La frase "medir la cantidad de analito macromolecular" se refiere a la determinación cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa del analito macromolecular. Los métodos que son cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, así como todos los demás métodos para determinar el analito macromolecular, se consideran métodos para medir la cantidad del analito macromolecular. Por ejemplo, un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito macromolecular en una muestra sospechosa de contener el analito macromolecular, 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. La frase "muestra sospechosa de contener el analito" incluye determinar si un analito está presente o no en una muestra. Por lo tanto, la frase se aplica para determinar tanto la presencia como la ausencia de analito en la muestra. Incluido dentro del alcance de la frase está el análisis de una muestra que no se sospecha que contenga el analito.

35 Como se ha mencionado anteriormente, el examen del reactivo conjugado o del medio implica la detección de una señal del reactivo conjugado o del medio. La presencia y/o cantidad de la señal están relacionadas con la presencia y/o cantidad del analito macromolecular en la muestra. El modo particular de detección depende de una o más de la naturaleza del sistema de ensayo particular empleado y la naturaleza de los miembros del sistema de producción de señales empleados, incluido el marcador. Como se ha descrito anteriormente, existen numerosos métodos mediante los cuales se puede emplear un marcador para dar como resultado la generación de una señal, que en algunas realizaciones es detectable por medios externos.

45 La activación de un sistema de producción de señales depende de la naturaleza de los miembros del sistema que producen señales. La luminiscencia o la luz producida como resultado de la activación del sistema de producción de señales puede medirse de forma visual, fotográfica, actinométrica, espectrofotométricamente o por cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad del mismo, que está relacionada con la cantidad de analito macromolecular en el medio. El examen de la presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que en general simplemente es una etapa en la que se lee la señal. La señal normalmente se lee usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, un fluorómetro, un espectrómetro de absorción, un luminómetro, un quimioluminómetro y similares.

50 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 algunas realizaciones, la temperatura durante la medición es esencialmente constante. En un enfoque, se forman curvas patrón utilizando concentraciones conocidas del analito. También se pueden usar calibradores y otros controles.

55 La concentración de analito macromolecular que puede analizarse generalmente oscila de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-17} M, más en general 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 macromolecular presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración del analito macromolecular normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos. El intervalo de interés de

concentración del analito macromolecular generalmente determinará las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo en el intervalo. Es decir, una variación en la concentración de analito macromolecular que sea importante debe proporcionar una diferencia de señal medible con precisión.

5 Descripción general de los ensayos en los que se pueden utilizar los anticuerpos

La siguiente discusión es a modo de ilustración y no de limitación. Los enfoques de acuerdo con los principios descritos en este documento pueden emplearse en cualquier formato de ensayo que permita un método que esté de acuerdo con los principios descritos en este documento. El formato del ensayo debe permitir la unión de un compañero de unión de un analito macromolecular al analito macromolecular donde se bloquea la unión o se dificulta estéricamente la unión entre una molécula pequeña asociada con el compañero de unión del analito macromolecular y un compañero de unión de la molécula pequeña.

Los ensayos pueden realizarse sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo y pueden ser manuales o automatizados. Los ensayos heterogéneos generalmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Los ensayos implican la unión entre miembros de un par de unión específico. Los miembros del par de unión específico en muchos casos son miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo y los ensayos se denominan inmunoensayos. Como se ha descrito anteriormente, otros pares de unión específicos como, por ejemplo, biotina-avidina, hormonas-receptores hormonales, enzima-sustrato, dúplex de ácidos nucleicos, IgG-proteína A, y pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN, son pares no inmunológicos pero están incluidos dentro del alcance del miembro de pares de unión específicos. Son aplicables métodos de ensayo similares a las técnicas de inmunoensayo a miembros de pares de unión específicos distintos de los pares de unión específicos de antígeno-anticuerpo.

En muchas realizaciones, los inmunoensayos implican reactivos marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos marcados incluyen, entre otros, inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayos, ensayo de inhibición, ensayos de luminiscencia inducida y ensayos de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo. Dentro del alcance de los ensayos que pueden emplearse están incluidos los inmunoensayos que usan una concentración limitada de uno de los reactivos de ensayo y los inmunoensayos que usan un exceso de uno o más de los reactivos principales.

Como se ha mencionado anteriormente, los ensayos pueden realizarse sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL) descrito en Rubenstein, et al., patente US n.º 3.817.837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; el inmunoensayo de luminiscencia inducida ("tecnología LOCI®") descrito en la patente US n.º 5.340.716 (Ullman, et al.); métodos de inmunofluorescencia como los descritos en Ullman, et al., patente US n.º 3.996.345, columna 17, línea 59, a columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización de enzimas ("ECIA") como los descritos en Maggio, et al., patente US n.º 4.233.402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") como se describe, por ejemplo, entre otros, en la patente US n.º 5.354.693; inmunoensayos enzimáticos, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("ELISA"). Ejemplos de ensayos heterogéneos son el radioinmunoensayo, descrito en Yalow, et al., J. Clin. Invest. 39: 1157 (1960).

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por un modulador enzimático ("EMMIA") descrito por Ngo y Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116: 285-288; el inmunoensayo de fluorescencia marcado con sustrato ("SLFIA") descrito por Oellerich, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1984) 22: 895-904; los inmunoensayos de donadores de enzimas combinados ("CEDIA") descritos por Khanna, et al., Clin. Chem. Acta (1989) 185: 231-240; inmunoensayos homogéneos marcados con partículas tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrica potenciada por partículas ("PETINIA"), e inmunoensayo turbidimétrico potenciada por partículas ("PETIA"), etc.; por ejemplo.

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de colorante disperso ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos de membrana enzimática ("EMIA"); luminoimunoensayos ("LIA"); etcétera. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensores que involucran la monitorización de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de un reactivo tras la unión de un analito. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensores ópticos, ensayos de inmunosensores acústicos, ensayos de inmunosensores semiconductores, ensayos de inmunosensores de transductores electroquímicos, ensayos de inmunosensores potenciométricos y ensayos de electrodos amperométricos.

En un ejemplo de un ensayo homogéneo, a modo de ejemplo y no de limitación, un reactivo conjugado que comprende una molécula pequeña y un compañero de unión de un analito macromolecular se combinan con un medio que contiene la muestra sospechosa de contener el analito macromolecular donde también se incluye un compañero de unión marcado de la molécula pequeña. Si el analito macromolecular está presente, el analito

macromolecular se une al compañero de unión del analito macromolecular, lo que dificulta estéricamente y bloquea la unión del compañero de unión marcado de la molécula pequeña a la molécula pequeña del reactivo conjugado. En este ejemplo, se realiza una disminución en la señal del marcador. La señal puede determinarse mediante técnicas convencionales y una reducción en la cantidad de señal está relacionada con la cantidad del analito macromolecular en la muestra.

Muchos ensayos conocidos utilizan un sistema de producción de señales que emplea el primer y segundo miembros de sistema de producción de señales. Los miembros del sistema de producción de señales pueden estar relacionados en el sentido de que la activación de un miembro del sistema de producción de señales produce un producto tal como, por ejemplo, luz, que da como resultado la activación de otro miembro del sistema de producción de señales.

En una variación homogénea del ensayo anterior, una muestra sospechosa de contener un analito macromolecular en un medio adecuado se pone en contacto con un soporte que tiene unido al mismo una molécula pequeña y un compañero de unión del analito macromolecular; el soporte comprende un marcador. Opcionalmente, el medio se incuba durante un periodo de tiempo. El soporte se pone en contacto con un compañero de unión marcado de la molécula pequeña que comprende un segundo marcador en la que un producto de la activación de uno de los marcadores es reactivo con el otro marcador. Después de un periodo de incubación, el soporte se examina para detectar la presencia de una señal, que está relacionada con la presencia o la cantidad de analito.

En una variación heterogénea del ensayo anterior, una muestra sospechosa de contener un analito macromolecular en un medio adecuado se pone en contacto con un soporte que tiene unido al mismo una molécula pequeña y un compañero de unión del analito macromolecular. El medio se incuba durante un periodo de tiempo. El soporte se separa del medio y se lava para eliminar los materiales no unidos. El soporte se pone en contacto con un compañero de unión marcado de la molécula pequeña. Después de un periodo de incubación, se examina el soporte para detectar la presencia de una señal del marcador, que se relaciona con la presencia o la cantidad de analito.

En algunas realizaciones de ensayos conocidos, los miembros del sistema de producción de señales comprenden un sensibilizador tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador y una composición quimioluminiscente en la que la activación del sensibilizador da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. Un miembro del sistema de producción de señales genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de miembro del sistema de producción de señales unido y/o no unido, es decir, la cantidad de miembro del sistema de producción de señales unido o no unido al reactivo conjugado o a un agente que refleja la cantidad del analito macromolecular a detectar. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, el marcador empleado, por ejemplo, en el compañero de unión marcado de la molécula pequeña, puede ser uno de los reactivos sensibilizadores o el reactivo quimioluminiscente o puede ser un miembro del par de unión específico que se une a un miembro del par de unión específico complementario que comprende el sensibilizador o el reactivo quimioluminiscente. El otro de los marcadores, por ejemplo, el sensibilizador o reactivo quimioluminiscente, puede unirse al reactivo conjugado que comprende la molécula pequeña y el compañero de unión del analito macromolecular. Una realización de dicho ensayo es el inmunoensayo de luminiscencia inducida (ensayo LOCI®). Como se ha indicado anteriormente, el inmunoensayo de luminiscencia inducida se describe en la patente US n.º 5.340.716 (Ullman).

Un compuesto quimioluminiscente (quimioluminiscente) es un compuesto que se puede activar químicamente y, como resultado de dicha activación, emite luz a una cierta longitud de onda. Los ejemplos de quimioluminiscentes, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen olefinas capaces de reaccionar con oxígeno singlete o un peróxido para formar hidroperóxidos o dioxetanos, que pueden descomponerse en cetonas o derivados de ácido carboxílico; dioxetanos estables que pueden descomponerse por acción de la luz; acetilenos que pueden reaccionar con el oxígeno singlete para formar dicetonas; hidrazonas o hidrazidas que pueden formar compuestos azo o azo carbonilos como el luminol; y compuestos aromáticos que pueden formar endoperóxidos, por ejemplo. Como consecuencia de la reacción de activación, los quimioluminiscentes causan directa o indirectamente la emisión de luz.

Un sensibilizador es una molécula, generalmente un compuesto, para la generación de un intermedio reactivo tal como, por ejemplo, oxígeno singlete, para la activación de un compuesto quimioluminiscente. En algunas realizaciones, el sensibilizador es un fotosensibilizador. Otros sensibilizadores que pueden activarse químicamente (por ejemplo, mediante enzimas y sales metálicas) incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, otras sustancias y composiciones que pueden producir oxígeno singlete con o, menos preferiblemente, sin activación por una fuente de luz externa. Por ejemplo, se ha demostrado que ciertos compuestos catalizan la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno singlete y agua. También se incluyen dentro del alcance de los fotosensibilizadores los compuestos que no son sensibilizadores verdaderos pero que, por excitación por calor, luz, radiación ionizante o activación química, liberarán una molécula de oxígeno singlete. Los miembros de esta clase de compuestos incluyen, por ejemplo, los endoperóxidos tales como el 1,4-biscarboxietil-1,4-naftaleno endoperóxido, 9,10-difenilantraceno-9,10-endoperóxido y 5,6,11,12-tetrafenil naftaleno 5,12-endoperóxido. El calentamiento o la absorción directa de la luz por estos compuestos libera oxígeno singlete.

Un fotosensibilizador es un sensibilizador para la activación de un compuesto fotoactivo, por ejemplo, mediante la generación de oxígeno singlete por excitación con luz. Los fotosensibilizadores son fotoactivables e incluyen, por ejemplo, tintes y compuestos aromáticos, y generalmente son compuestos que comprenden átomos unidos covalentemente, en general con múltiples enlaces dobles o triples conjugados. Los compuestos deben absorber la luz en el intervalo de longitud de onda de 200 a 1100 nm, o de 300 a 1000 nm, o de 450 a 950 nm, con un coeficiente de extinción a su absorbancia máxima superior a $500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o superior a $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o superior a $50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a la longitud de onda de excitación. Los fotosensibilizadores deberían ser relativamente fotosensibles y, preferiblemente, no reaccionar eficientemente con el oxígeno singlete. Los ejemplos de fotosensibilizadores, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen acetona, benzofenona, 9-tioxantona, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metalo-porfirinas, tales como hematoporfirina, ftalocianinas, clorofilas, rosa de bengala y buckminsterfullereno, por ejemplo, y derivados de estos compuestos.

Ejemplos de compuestos quimioluminiscentes y fotosensibilizadores que pueden utilizarse en realizaciones de ensayos que emplean métodos de acuerdo con los principios descritos en este documento se exponen en la patente US n.º 5.340.716 (Ullman, et al.).

En un ejemplo de un inmunoensayo de luminiscencia inducida a modo de ejemplo y no de limitación, el ensayo utiliza una partícula asociada con un reactivo quimioluminiscente en el que la partícula tiene una molécula pequeña (por ejemplo, biotina) y un compañero de unión del analito macromolecular unido a la partícula. Se emplea una segunda partícula que está marcada con un fotosensibilizador y tiene un compañero de unión para la molécula pequeña unida a la misma, como por ejemplo un compañero de unión para la biotina, como por ejemplo avidina o estreptavidina (reactivo fotosensibilizador). El reactivo quimioluminiscente que comprende la molécula pequeña y el compañero de unión del analito macromolecular se une al analito macromolecular y, como resultado, se bloquea la unión del compañero de unión de la molécula pequeña del reactivo fotosensibilizador a la molécula pequeña del reactivo quimioluminiscente, reduciendo así la cantidad de reactivo fotosensibilizador, se une al reactivo quimioluminiscente. Por lo tanto, cuanto mayor sea el analito macromolecular en la muestra, mayor será la reducción de la señal producida por el fotosensibilizador y el compuesto quimioluminiscente que se aproxima mucho en virtud de la unión del compañero de unión de la molécula pequeña con la molécula pequeña del reactivo quimioluminiscente. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el reactivo quimioluminiscente cuando los dos marcadores están muy cerca. El reactivo quimioluminiscente activado produce posteriormente luz. La cantidad de luz producida está inversamente relacionada con la cantidad del complejo formado entre el reactivo fotosensibilizador y el reactivo quimioluminiscente.

En algunos ejemplos de un ensayo de luminiscencia inducida a modo de ilustración y no de limitación, se emplea una partícula fotosensibilizadora que se conjuga con avidina o estreptavidina. Se emplea un compañero de unión biotinilado para el analito macromolecular como parte de un reactivo de partículas que está marcado con un reactivo quimioluminiscente. El medio de reacción se incuba para permitir que el compañero de unión del analito macromolecular se una al analito macromolecular y para permitir que las partículas fotosensibilizadoras se unan al analito macromolecular biotinilado en virtud de la unión entre la avidina y la biotina. A continuación, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que en su estado excitado es capaz de activar el oxígeno a un estado singlete. Debido a que el reactivo quimioluminiscente está ahora cerca del fotosensibilizador en virtud de la presencia del analito, se activa por el oxígeno singlete y emite luminiscencia. A continuación 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 y/o cantidad del analito. Debido a que la presencia de analito macromolecular en la muestra resulta en el bloqueo de la unión entre la molécula pequeña del reactivo quimioluminiscente y el compañero de unión de la molécula pequeña que forma parte del reactivo fotosensibilizador, se observa una disminución en la cantidad de señal producida en presencia de analito macromolecular y está relacionada con la cantidad de analito macromolecular en la muestra.

Otro ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, de un formato de ensayo para la detección de un analito macromolecular es un formato de ensayo que utiliza una partícula magnética tal como, por ejemplo, una partícula de cromo. Para este formato de ensayo, se emplean partículas de cromo, a las que se unen una molécula pequeña y un compañero de unión del analito macromolecular. También se emplea un reactivo que comprende un compañero de unión marcado de la molécula pequeña donde el marcador es, a modo de ilustración y no de limitación, una enzima tal como, por ejemplo, un éster de acridinio. El reactivo de partículas magnéticas se combina con una muestra que se sospecha que contiene el analito macromolecular, que, si está presente, se une al compañero de unión del analito macromolecular del reactivo de partículas magnéticas. Se añade el reactivo que comprende el compañero de unión marcado de la molécula pequeña y se incuba el medio. A continuación, se aplica un imán, que extrae todas las partículas magnéticas de la suspensión, y las partículas magnéticas o el sobrenadante se transfieren a un recipiente de reacción final. Las partículas magnéticas o el sobrenadante se examinan para determinar la cantidad de señal procedente del marcador, que se relaciona con la cantidad de analito macromolecular en la muestra. En un ejemplo donde el marcador es una enzima, se añade un sustrato para la enzima, y la actividad de la enzima se mide espectrofotométricamente como un cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo. La cantidad de esta señal está relacionada con la cantidad de analito macromolecular en la muestra. Cuando las partículas magnéticas se examinan para determinar la cantidad de señal, la cantidad de señal es

inversamente proporcional a la cantidad de analito macromolecular en la muestra. Cuando se examina el sobrenadante para determinar la cantidad de señal, la cantidad de señal es directamente proporcional a la cantidad de analito macromolecular en la muestra.

5 Como se ha mencionado anteriormente, la muestra y los reactivos se proporcionan en combinación en el medio. Si bien el orden de adición de los reactivos al medio puede variar, habrá ciertas preferencias para algunas realizaciones de los formatos de ensayo descritos en el presente documento. El orden de adición más simple, por supuesto, es añadir 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. En algunas realizaciones, se puede introducir una etapa de incubación después de cada adición como se ha descrito anteriormente. En ensayos heterogéneos, también pueden emplearse etapas de lavado después de una o más etapas de incubación.

Kits que comprenden reactivos para la realización de ensayos

15 Los reactivos para realizar un ensayo para un analito macromolecular de acuerdo con los principios descritos en el presente documento y otros reactivos para realizar un ensayo particular para un analito macromolecular pueden estar presentes en un kit útil para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito macromolecular. En algunos ejemplos, un kit comprende en una combinación empaquetada un reactivo conjugado que comprende una molécula pequeña y un compañero de unión del analito macromolecular. El reactivo conjugado puede ser una fase líquida o un reactivo en fase sólida donde el reactivo conjugado también comprende un soporte. El kit también puede comprender un compañero de unión marcado de la molécula pequeña y también puede incluir miembros de un sistema de producción de señales distinto del marcador. El kit puede incluir además otros reactivos para realizar el ensayo, y su naturaleza depende del formato de ensayo particular.

20 Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o se pueden combinar varios reactivos en uno o más recipientes, dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos empaquetados por separado para realizar un ensayo como, por ejemplo, miembros de pares de unión específicos adicionales, miembros del sistema que producen señales y reactivos auxiliares.

30 Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimizan esencialmente las reacciones que deben ocurrir durante los métodos de ensayo y además para optimizar esencialmente la sensibilidad de un ensayo. Bajo 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 tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo utilizando realizaciones del presente conjugados. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método como se describe anteriormente.

Definiciones

35 Las siguientes definiciones, como se usan en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, se proporcionan para términos y frases que no se han definido específicamente de otro modo anteriormente. Debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares y no pretende ser limitante.

La frase "al menos" como se usa en este documento significa que el número de elementos especificados puede ser igual o mayor que el número recitado.

40 La frase "aproximadamente" como se usa en este documento significa que el valor designado puede variar más o menos el doce por ciento, o el once por ciento, o el diez por ciento, o el nueve por ciento, o el ocho por ciento, o el siete por ciento, o el seis por ciento, o el cinco por ciento, o el cuatro por ciento, o el tres por ciento, o el dos por ciento, o el uno por ciento. Por ejemplo, "aproximadamente 5" con una variación de más o menos el 10 % significa un intervalo de 4,5 a 5,5.

45 Las designaciones "primero" y "segundo" se usan únicamente con el fin de diferenciar entre dos elementos como, por ejemplo, "primer marcador" y "segundo marcador", o "primer miembro sbp" y "segundo miembro sbp" y no se pretende que implique ninguna secuencia, orden o importancia para un elemento sobre otro o cualquier orden de adición, por ejemplo.

50 Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

El término "esencialmente" cuando no se define específicamente anteriormente varía con el contexto según entienden los expertos en la técnica relevante y generalmente significa al menos el 70 %, o al menos el 80 %, o al

menos el 90 %, o al menos el 95 %, o menos el 99 %, o el 100 %.

"Opcionalmente" significa que el elemento especificado puede estar presente o no estar presente.

5 Los siguientes ejemplos describen con más detalle 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 el presente documento están en volumen, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplos

10 En el siguiente ejemplo, se empleó un formato de ensayo ELISA para cuantificar anticuerpos anti-BSA en una muestra de suero de ratón inmunizado, es decir, suero de ratones que se inocularon previamente con un inmunógeno basado en BSA. La BSA biotinilada se produjo e inmovilizó en una placa ELISA para servir como fase de captura para los anticuerpos anti-BSA de la muestra, con la subsiguiente generación de la señal proporcionada por un conjugado de estreptavidina-HRP disponible en el mercado.

Materiales:

A menos que se indique lo contrario, los reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI) y se usaron tal como se recibieron.

15 Abreviaturas:

BSA - albúmina de suero bovino
 HRP - peroxidasa de rábano
 NHS - N-hidroxisuccinimida
 20 PEG - polietilenglicol
 hrs - horas
 min - minutos
 ml - mililitros
 mg - miligramos
 g - gramos
 25 mM - milimolar
 kDa - kilodalton(s)
 nm - nanómetro(s)
 vol - volumen
 p - peso

30 Preparación de reactivos

Para formar el material antigénico biotinilado, se derivó albúmina de suero bovino con reactivos de biotinilación a través de aminas primarias y grupos tiol. Para el material derivado de amina, se disolvieron 60 mg de albúmina de suero bovino (Millipore Corp., Kankakee IL) a una concentración de 10 mg/ml en fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0/NaCl 300 mM, y a continuación se dividió en 3 alícuotas x 20 mg. A cada alícuota respectiva se le añadió NHS-PEG₄-biotina (Thermo Scientific, Rockford IL) suficiente para una relación de exposición molar 2:1, 5:1 y 10:1 de biotina a proteína. Las mezclas se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas, y a continuación las mezclas se purificaron en el mismo tampón a pH 7 en una columna de SEPHADEX® G-25 de 1,6 x 28 cm (GE Healthcare BioSciences, Uppsala, Suecia). La concentración de proteína del producto se determinó por absorbancia a A280 nm.

40 Para el material derivado de tiol, se disolvió BSA a 10 mg/ml en fosfato de sodio 100 mM a pH 8,0. Se añadió yodoacetil-PEG₂-biotina (Thermo Scientific, Rockford IL) en una cantidad suficiente para una relación de exposición molar de 20:1 de biotina a proteína. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante la noche, y a continuación la mezcla se fraccionó en una columna BIOSEP® SEC-S3000 de 21,2 x 300 mm (Phenomenex, Torrance CA) en fosfato de sodio 10 mM pH 7,0/NaCl 300 mM; las fracciones del monómero de 66 kDa se agruparon. La concentración de proteína del producto se determinó por absorbancia a A280 nm.

Ensayo

50 Placas ELISA de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Thermo Fisher Nunc, Rochester, NY) se recubrieron por separado con las diversas preparaciones de BSA biotiniladas de las concentraciones diana diluidas anteriores a 1 µg/ml. Las placas se lavaron con una solución de lavado, que consistía en agua desionizada que contenía el 0,05 % vol/vol de TWEEN® 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se bloqueó con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco de BioWhittaker (Lonza, Walkersville, MD) con la adición de caseína al 0,5 % p/vol (MP Biomedicals, LLC,

5 Solon, OH) y TWEEN® 20 al 0,05 % vol/vol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y a continuación se volvió a lavar con la solución de lavado. A continuación se añadieron diluciones de la muestra de suero de ratón, inmunizada frente a un control de suero no inmunizado, seguido de otra etapa de lavado como se ha indicado anteriormente. Se añadió conjugado de estreptavidina-HRP (ZyMed, San Francisco CA) a una dilución de 1:1000, seguido de una última etapa de lavado con la solución de lavado anterior. Se añadió sustrato TMB (Moss Substrates, Inc., Pasadena MD) y la señal generada se midió mediante A650 nm.

10 La Figura 1 indica los resultados para cada uno de los cuatro materiales de BSA biotinilados producidos, expresados como la A650 de la respuesta sérica no inmunizada que se resta de la respuesta inmunizada frente a la dilución sérica. Se produce una diferencia decreciente con respecto a la dilución de la muestra a partir de la generación de señal creciente debido a cantidades reducidas de anticuerpos de muestra anti-BSA que bloquean físicamente la unión de biotina de la BSA biotinilada con la estreptavidina del conjugado de estreptavidina-HRP.

15 La Figura 2 es una nueva gráfica de los datos para el material con el mejor rendimiento de más arriba, la BSA-yodoacetil-PEG₂-biotina (derivada con tiol), expresada como A650 frente a dilución de suero tanto para suero inmunizado como no inmunizado. Se presenta que la muestra no inmunizada da una señal constantemente alta independientemente de la dilución, ya que no hay un anticuerpo anti-BSA presente en la muestra para bloquear la unión del conjugado de estreptavidina-HRP a la BSA biotinilada inmovilizada. En contraste, la muestra inmunizada muestra una señal baja de una baja dilución de la muestra debido al efecto de bloqueo de los anticuerpos anti-BSA presentes en la muestra, con un aumento constante de la señal con una dilución creciente debido a la disminución de las cantidades de bloqueo de la unión de la biotina de la BSA biotinilada con la estreptavidina del conjugado de estreptavidina-HRP.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un analito macromolecular en una muestra sospechosa de contener el analito macromolecular, comprendiendo el método:
 - 5 (a) combinar en un medio la muestra y un reactivo conjugado que comprende una molécula pequeña y un compañero de unión del analito macromolecular,
 - (b) combinar el reactivo conjugado y un compañero de unión marcado de la molécula pequeña, y
 - (c) examinar el reactivo conjugado o el medio en busca de una cantidad de compañero de unión marcado de la molécula pequeña que se une a la molécula pequeña y relacionar su cantidad con la cantidad del analito macromolecular en la muestra,
- 10 en el que dicho analito macromolecular, cuando está presente, se une al compañero de unión del analito macromolecular y tiene un tamaño o una forma o una combinación de tamaño y forma que dificulta la capacidad del compañero de unión para que la molécula pequeña se una a la molécula pequeña cuando la molécula pequeña es parte del reactivo que también comprende el compañero de unión que es específico para la sustancia macromolecular, en el que el analito macromolecular tiene un peso molecular de al menos 5000 y se selecciona del
 - 15 grupo que consiste en anticuerpos, enzimas, hormonas, polinucleótidos, y carbohidratos, y en el que la molécula pequeña es una molécula orgánica que tiene un peso molecular en el intervalo de 100 a 2000, comprende grupos funcionales que son reactivos con el compañero de unión del analito macromolecular y está unida al compañero de unión del analito macromolecular.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el reactivo conjugado comprende además un soporte al
 - 20 que se unen la molécula pequeña y el compañero de unión del analito macromolecular.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el analito macromolecular es un analito de anticuerpo, el compañero de unión del analito macromolecular es un antígeno que se une al analito de anticuerpo, y la molécula pequeña y el antígeno que se une al analito de anticuerpo se unen a un soporte,
 - 25 el método comprendiendo además:
 - incubar el medio en condiciones para la unión del compañero de unión marcado a la molécula pequeña, y examinar el soporte o el medio en busca de una cantidad de compañero de unión marcado unida a la molécula pequeña y relacionar su cantidad con la cantidad del analito de anticuerpo en la muestra.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en el que la molécula pequeña se selecciona del grupo que consiste en biotina, destiobiotina, dinitrofenol, digoxina, digoxigenina, rodamina y fluoresceína.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en el que el marcador del compañero de unión marcado se
 - 30 selecciona del grupo que consiste en enzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, electroluminiscentes, sensibilizadores y materiales radiactivos.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en el que la muestra es una excreción corporal, una aspiración corporal, una extirpación corporal o un extracto corporal.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en el que el método es un método de ensayo homogéneo.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el soporte es una partícula no magnética, una partícula magnética, una placa o un tubo.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el soporte comprende un marcador en la que el marcador es interactivo con el marcador del compañero de unión marcado.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la molécula pequeña y el antígeno que se une al analito de anticuerpo están unidos a una partícula,
 - 40 el método comprendiendo además:
 - incubar el medio en condiciones para la unión del compañero de unión marcado a la molécula pequeña, y examinar el soporte o el medio en busca de una cantidad de compañero de unión marcado unida a la molécula pequeña y relacionar su cantidad con la cantidad del analito de anticuerpo en la muestra.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el compañero de unión marcado se marca con una partícula que comprende un marcador sensibilizador y la partícula que tiene unida a la misma una molécula pequeña comprende un marcador quimioluminiscente.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la partícula que tiene unida a ella una molécula pequeña es una partícula magnética.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la molécula pequeña está unida al antígeno, que está unido a la partícula.

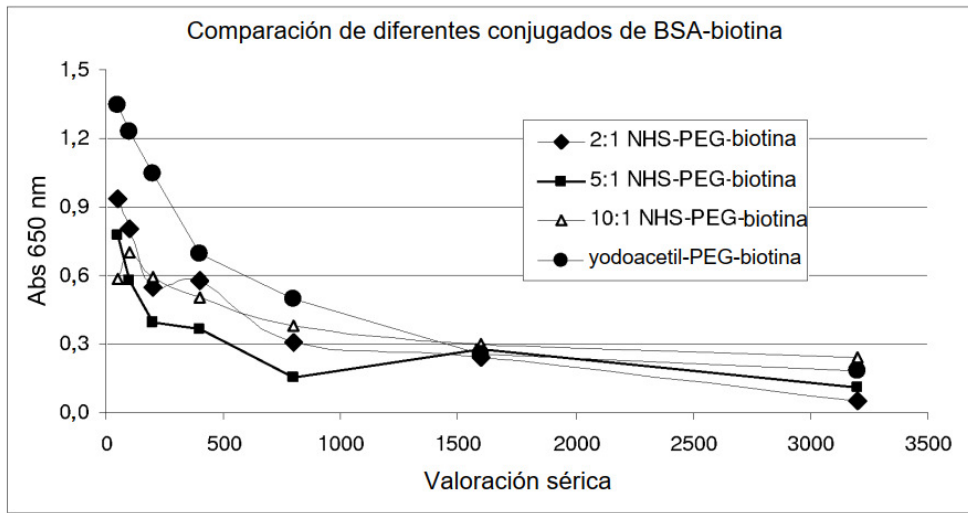


Fig. 1

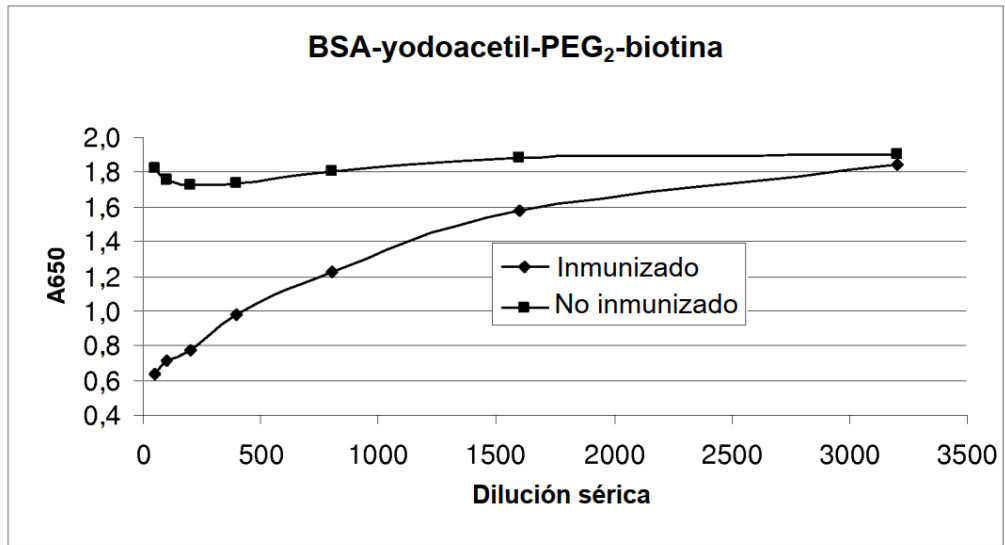


Fig. 2