

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 634**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2014 PCT/US2014/037909**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14186402**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2014 E 14797839 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2997039**

54 Título: **Formulaciones líquidas estabilizadas que contienen receptores**

30 Prioridad:

14.05.2013 US 201361823116 P

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

11.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KIAEI, DAVID

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 747 634 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

Formulaciones líquidas estabilizadas que contienen receptores

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de EE.UU. N° de serie 61/823.116 presentada el 14 de mayo de 2013.

Antecedentes

10 En el presente documento se describen composiciones, métodos y kits para la determinación de analitos tales como, por ejemplo, anticuerpos, en muestras, tales como muestras de paciente, que se sabe o se sospecha que contienen uno o más de dichos analitos. En algunos ejemplos, la invención se refiere más particularmente a mantener la estabilidad de reactivos de receptor durante el almacenamiento como formulaciones líquidas a temperaturas por encima de la congelación. En algunos ejemplos, la invención se refiere más particularmente a potenciar la sensibilidad de reactivos de receptor para su uso en ensayos para analitos.

15 El campo de diagnóstico clínico ha experimentado una amplia expansión durante los últimos 35 años o más, tanto en cuanto a la variedad de materiales de interés que se pueden determinar fácilmente y con exactitud, así como 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 la química clínica, estos materiales pueden estar presentes en líquidos corporales en concentraciones inferiores a 10^{-12} molar. La dificultad de detectar bajas concentraciones de estos materiales se potencia por los tamaños de muestras relativamente pequeños que se pueden utilizar.

20 La necesidad de determinar muchos analitos en sangre y otros líquidos biológicos ha llegado a ser cada vez más evidente en muchas ramas de la medicina. En la endocrinología, se requiere frecuentemente el conocimiento de la concentración plasmática de varias hormonas diferentes para resolver un problema de diagnóstico o un panel de marcadores para un diagnóstico dado donde las relaciones podrían ayudar en la determinación de la progresión de la enfermedad. Se usan comúnmente receptores tales como receptores de hormona en varias aplicaciones *in vitro*. En ensayos de diagnóstico se usan, por ejemplo, receptores tales como, por ejemplo, receptores de hormona para la detección de anticuerpos de paciente que son indicativos de uno o más estados de enfermedad. En un ejemplo particular, se usan receptores de tirotrópina (también conocida como hormona estimulantes de la tiroides o TSH) en ensayos de diagnóstico para la detección de anticuerpos de receptores de TSH como una ayuda en el diagnóstico diferencial de enfermedad de Graves. El documento de patente WO 97/46206 se refiere a composiciones de receptor de tirotrópina humana y a métodos de diagnóstico y terapéuticos de uso de ellas. Este documento de patente describe en la página 29 la preparación de un receptor de TSH solubilizado, en donde se usan EDTA (agente quelante) y glicerol.

35 Debido a su inestabilidad en forma líquida, muchos receptores o bien se secan sobre una superficie o bien se liofilizan. Estos enfoques no son deseables puesto que se añaden al coste de fabricación y son inconvenientes para los que usan los reactivos. Además, tras la reconstitución para su uso, muchos de dichos receptores todavía tienen una semivida muy corta.

Existe, por tanto, una necesidad continua de desarrollar composiciones que comprendan receptores que presenten una buena estabilidad en una forma líquida y buena sensibilidad en un ensayo empleando los receptores para medir los niveles de anticuerpos y otros analitos en pacientes.

Sumario

40 En el presente documento se describen métodos de preparación de una solución líquida de un receptor. Los métodos comprenden combinar en un medio líquido el receptor, un agente quelante y un poliol C2-C6. Una cantidad del agente quelante y el poliol C2-C6 es suficiente para lograr un receptor estable y sensible en la solución líquida, que se mantiene a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 40 °C durante el almacenamiento.

45 En el presente documento se describen métodos de estabilización de una solución líquida de un receptor de hormona estimulante de la tiroides. El método comprende combinar una solución líquida que comprende un receptor de hormona estimulante de la tiroides con una cantidad estabilizante de tanto (i) un agente quelante seleccionado del grupo que consiste en agentes quelantes de ácido triacético y agentes quelantes de ácido tetraacético y (ii) un poliol C3-C5.

50 En el presente documento se describen composiciones que comprenden un medio acuoso, una quimera de receptor, un agente quelante en una cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM y un poliol C2-C6 en

una cantidad de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 % en peso.

Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a métodos de detección de un receptor de anticuerpo de hormona estimulante de la tiroides en una muestra. Se proporciona una combinación en un medio de ensayo donde la combinación comprende una muestra que se sospecha que contiene un anticuerpo de receptor de hormona estimulante de la tiroides, un primer receptor de hormona estimulante de la tiroides unido a un soporte y un segundo receptor de hormona estimulante de la tiroides unido a una marca. Cualquiera o ambos del primer y segundo receptores de hormona estimulante de la tiroides son de composiciones guardadas según los principios descritos en el presente documento. La combinación se examina para la formación de un complejo que comprende el anticuerpo de receptor de hormona estimulante de la tiroides. La presencia del complejo está relacionada con una o ambas de una presencia y una cantidad del anticuerpo de receptor de hormona estimulante de la tiroides en la muestra.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos proporcionados en el presente documento no están a escala y se proporcionan con el fin de facilitar el entendimiento de ciertos ejemplos según los principios descritos en el presente documento y se proporcionan a modo de ilustración.

La Fig. 1 es un gráfico que representa un gráfico de señal frente a pH para una quimera de receptor conjugada con fosfatasa alcalina (el "conjugado") tras la disolución en tampón citrato y, por tanto, para los fines de comparación, tras la disolución del conjugado en tampones MES y PIPES, respectivamente.

La Fig. 2 es un gráfico que representa un gráfico de porcentaje de señal retenida frente a pH para las soluciones de conjugado de la Fig. 1 después del almacenamiento a 37 °C durante un día.

Descripción detallada

Discusión general

La divulgación según los principios descritos en el presente documento proporciona métodos de preparación de formulaciones líquidas de receptores que se pueden almacenar durante periodos prolongados de tiempo mientras se mantiene la estabilidad del receptor. Además, los presentes inventores han descubierto que la sensibilidad de los receptores preparados según los principios descritos en el presente documento se potencia con respecto a la de los receptores sometidos a secado o liofilización y posterior reconstitución. Como se ha mencionado anteriormente, algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a métodos de preparación de una solución líquida de un receptor, almacenamiento de dichas soluciones líquidas, y uso de dichas soluciones líquidas en ensayos para la detección de analitos de interés.

Discusión detallada

El término "receptor", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que se unen con una sustancia (algunas veces denominado un ligando) para la que son estructuralmente específicos. Los receptores tienen un área sobre la superficie o en una cavidad, que se une específicamente a y así se define como complementaria con una organización espacial y polar particular de otra molécula algunas veces denominada un ligando. Los ligandos pueden ser moléculas pequeñas que incluyen, pero no se limitan a, fármacos, péptidos pequeños o esteroides, por ejemplo, o moléculas grandes tales como péptidos grandes, proteínas que incluyen anticuerpos, hormonas, ADN, ARN, hidratos de carbono, por ejemplo, y que incluyen porciones o regiones de los mismos. A modo de ilustración y no limitación, los receptores incluyen receptores de hormona, receptores de fármaco y receptores de antígeno, por ejemplo. El receptor puede ser un receptor intacto o completo o un fragmento o segmento del mismo. Los fragmentos o segmentos se pueden preparar sometiendo un receptor intacto a técnicas de fragmentación. Por otra parte, se pueden preparar sintéticamente los fragmentos o segmentos de receptores, así como los receptores intactos o completos. Así, el receptor puede ser que exista de forma natural y aislado de una fuente o el receptor puede ser sintético y preparado por técnicas sintéticas que incluyen, pero no se limitan a, técnicas recombinantes y técnicas quiméricas, por ejemplo.

En algunos ejemplos, los receptores son los que son específicos para anticuerpos tales como, por ejemplo, autoanticuerpos que están asociados con ciertos estados de enfermedad, que incluyen, pero no se limitan a, dermatomiositis, diabetes mellitus, epilepsia, enfermedad de Kawasaki, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad inflamatoria del intestino, nefritis lúpica, esclerosis múltiple, miastenia grave, miocarditis, enfermedad de Parkinson, pénfigo, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo, granulomatosis de Wegener y enfermedades de Wilson, por ejemplo.

En un ejemplo según los principios descritos en el presente documento, a modo de ilustración y no limitación, el receptor es un receptor de TSH y los autoanticuerpos son autoanticuerpos de TSH. En otro ejemplo según los principios descritos en el presente documento, a modo de ilustración y no limitación, el receptor es una quimera de receptor de TSH y los autoanticuerpos son autoanticuerpos de TSH. En otro ejemplo según los principios descritos en el presente documento, a modo de ilustración y no limitación, los receptores son quimeras de receptor de TSH, ejemplos de las cuales se desvelan en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2009/0325310 A1 (Loos) publicada el 31 de diciembre de 2009, y los autoanticuerpos son autoanticuerpos de TSH.

El término "receptor" también incluye receptores fijados o unidos a un resto de conjugación. Los conjugados de receptor comprenden un receptor y un resto de conjugación fijados juntos, opcionalmente mediante un grupo de enlace, para formar una única estructura. La unión puede ser el resultado de cualquier unión covalente o unión no covalente. La unión covalente implica una conexión directa, por ejemplo, un enlace químico entre un receptor y un resto de conjugación o entre un receptor y un resto de conjugación mediante la mediación de un grupo de enlace. La unión no covalente implica la unión específica entre los miembros del par de unión específica complementaria (sbp) que se unen a un receptor y un resto de conjugación del conjugado.

El resto de conjugación es cualquier entidad que se pueda conjugar con un receptor para formar un reactivo que se emplea en un ensayo para la detección del receptor o una entidad a la que se une el receptor (analito de unión al receptor). Los restos de conjugación incluyen, a modo de ilustración y no limitación, soportes, miembros de un sistema productor de señales, miembros de pares de unión tales como, por ejemplo, ligandos y receptores (por ejemplo, biotina-estreptavidina o anticuerpos fluoresceína-anti-fluoresceína), y macromoléculas que proporcionan anclajes a un análogo de fármaco, por ejemplo.

Un soporte puede estar comprendido de un sólido o fluido orgánico o inorgánico, material insoluble en agua, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede ser sintético o existir de forma natural. El soporte puede tener cualquiera de varias formas, tales como partícula, que incluye perla, película, membrana, tubo, pocillo, tira, varilla, superficies planas tales como, por ejemplo, placa, papel, etc., fibra, y similares. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede o puede no ser suspendible en el medio en el que se emplea. Los ejemplos de soportes suspendibles son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles, partículas metálicas, y partículas magnéticas, por ejemplo. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como polisacárido reticulado que incluye agarosa y dextrano, por ejemplo, celulosa, nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(alcohol vinílico), poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polimetacrilatos, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon y poli(butirato de vinilo), por ejemplo, ya sean usados por sí mismos o conjuntamente con otros materiales.

El soporte puede ser una partícula. Las partículas pueden tener un diámetro medio de al menos aproximadamente 0,02 micrómetros y no superior a aproximadamente 100 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro medio desde aproximadamente 0,05 micrómetros hasta aproximadamente 20 micrómetros, o desde aproximadamente 0,3 micrómetros hasta aproximadamente 10 micrómetros. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferentemente de una densidad que se aproxima al agua, generalmente desde aproximadamente 0,7 g/ml hasta aproximadamente 1,5 g/mL, y compuesta de material que puede ser transparente, parcialmente transparente, u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, y virus, por ejemplo. Las partículas también pueden estar comprendidas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, partículas metálicas, partículas magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones y lipoproteínas, por ejemplo. En algunos ejemplos, las partículas son partículas de látex o partículas de dióxido de cromo (cromo). En algunos ejemplos, las partículas son fácilmente dispersables en un medio acuoso y pueden ser adsorptivas o funcionalizables para permitir la conjugación con un receptor, ya sea directamente o indirectamente mediante un grupo de enlace.

Los sistemas productores de señales específicas y marcas se tratan con más detalle en el presente documento más adelante en la discusión de diversos sistemas de ensayo a los que se pueden aplicar los ejemplos según los principios descritos en el presente documento. Brevemente, un sistema productor de señales (sps) puede tener uno o más componentes o miembros, siendo al menos un componente o miembro una marca, que es capaz de ser detectado directamente o es detectable mediante una reacción de unión específica que produce una señal detectable. El sistema productor de señales genera una señal que se refiere a la presencia de un receptor o un analito de unión al receptor en una muestra. El sistema productor de señales incluye todos de los reactivos requeridos para producir una señal medible. Otros componentes del sistema productor de señales se pueden incluir en una solución reveladora y pueden incluir sustratos, potenciadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, secuestrantes, iones metálicos y sustancias de unión específica requeridas para la unión de sustancias generadoras de señales, por ejemplo. Otros componentes del sistema productor de señales pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, por ejemplo. El sistema productor de señales proporciona una señal detectable por medios externos, por uso de radiación electromagnética, deseablemente por examen visual. Los sistemas productores de señales a modo de ejemplo se describen en la patente de EE.UU. N° 5.508.178 (Rose, et al.) y Ullman, et al., la patente de EE.UU. N° 5.185.243,

columnas 11-13.

Para la unión covalente de los componentes de un conjugado, que es un receptor y un resto de conjugación, uno o más de los componentes contienen un grupo funcional adecuado para la unión a uno o más de los otros componentes. Los grupos funcionales adecuados para la unión a los componentes pueden ser funcionalidades carbonilo, tanto oxocarbonilo, por ejemplo, aldehído, como no oxocarbonilo (incluyendo análogos de nitrógeno y azufre), por ejemplo, carboxi, amidina, amidato, tiocarboxi y tionocarboxi. Las funcionalidades alternativas de oxo incluyen halógeno activo, diazo, mercapto, olefina, olefina particularmente activada, amino, fosforo y similares. Son de particular interés los ésteres o agentes alquilantes activados. Los detalles de técnicas para la unión de moléculas entre sí se pueden encontrar, por ejemplo, en Matthews, et al., *Anal. Biochem.* (1985) 151:205-209; Engelhardt, et al., solicitud de patente europea N° 0302175 y patente de EE.UU. N° 3.817.837.

Como se ha mencionado anteriormente, se pueden lograr la unión covalente mediante la mediación de un grupo de enlace. El grupo de enlace puede ser una cadena de desde 1 hasta aproximadamente 50 o más átomos, o desde 1 hasta aproximadamente 30 o más átomos, desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 átomos, desde 1 hasta aproximadamente 10 átomos, cada uno independientemente seleccionado del grupo que normalmente consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo, normalmente carbono y oxígeno. El número de heteroátomos en el grupo de enlace puede variar desde 0 hasta aproximadamente 10 o más, o desde 0 hasta aproximadamente 8, desde 1 hasta aproximadamente 6, desde 2 hasta aproximadamente 4. El número de átomos en la cadena se determina contando el número de átomos distintos de hidrógeno u otros átomos monovalentes a lo largo de la vía más corta entre las subestructuras que se conectan. Los átomos del grupo de enlace se pueden sustituir con átomos distintos de hidrógeno tales como carbono, oxígeno, etc., en la forma, por ejemplo, de alquilo, arilo, aralquilo, hidroxilo, alcoxi, ariloxi y aralcoxi, por ejemplo. Como regla general, la longitud de un grupo de enlace particular se puede seleccionar arbitrariamente para proporcionar comodidad de síntesis, con la condición de que haya interferencia mínima provocada por el grupo de enlace con la capacidad de los compuestos para unirse juntos. El grupo de enlace puede ser alifático o aromático. Las funcionalidades presentes en el grupo de enlace pueden incluir ésteres, tioésteres, amidas, tioamidas, éteres, ureas, tioureas, guanidinas, grupos azo, tioéteres, carboxilato, etc.

Como se indica anteriormente, se pueden unir juntos no covalentemente los componentes, es decir, receptor y resto de conjugación, de los conjugados de receptor-resto. Por ejemplo, una molécula orgánica pequeña tal como, pero no se limita a, biotina, que incluye bis-biotina, y fluoresceína, por ejemplo, se puede incorporar en uno de los componentes y el otro componente se puede unir a un componente de unión para la molécula orgánica pequeña tal como, por ejemplo, respectivamente, avidina (estreptavidina) o anti-fluoresceína. La unión de los componentes de unión da como resultado la unión no covalente de los componentes entre sí.

Los métodos que se describen en el presente documento comprenden combinar en un medio líquido el receptor y cantidades eficaces de un agente quelante y un poliol C2-C6. El agente quelante puede ser, pero no se limita a, ácido N-(2-hidroxietyl)-etilendiamina-N,N',N'-triacético (HEDTA), ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA), ácido trans-1,2-diamino-ciclohexan-N,N',N'-tetraacético (CDTA), ácido etilenglicol-O,O'-bis-(2-aminoetyl)-N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido dietilentriammina-pentaacético (DTPA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido nitrilo-2,2',2"-triacético, ácido dietilentriammina-N,N',N',N"-pentaacético, ácido trietilentetramina-N,N,N',N",N",N"-hexaacético (TTHA), metilamina, histidina, malato y fitoquelatina, hemoglobina, clorofila, sideróforo, piocianina, pioverdina, enterobactina, péptidos y azúcares, ácido húmico, ácido cítrico, ablandadores de agua, fosfonatos, tetraciclina, gadolinio, compuesto de organofósforo 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo, ácido pentético; N,N-bis(2-(bis-(carboximetil)amino)etyl)-glicina, N,N-bis(carboximetil)glicina, ácido triglicolámico; [ácido (carboximetil)imino]bis-(etilennitrilo)]-tetraacético), trilona A, ácido α,α',α'' -trimetilaminatricarboxílico, tri(carboximetil)amina, ácido aminotriacético, Titriplex I y ácido NTA de Hampshire, por ejemplo, y sales apropiadas de cualquiera de los anteriores.

En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, el agente quelante comprende un resto de ácido triacético o una sal del mismo, un resto de ácido tetraacético o una sal del mismo, un resto de ácido pentaacético o una sal del mismo, o un resto de ácido hexaacético o una sal del mismo. En algunos ejemplos, el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en ácido N-(2-hidroxietyl)-etilendiamina-N,N',N'-triacético y sus sales, ácido etilendiaminatetraacético y sus sales, y ácido etilenglicol-tetraacético y sus sales. En algunos ejemplos, el agente quelante es un ácido cítrico o una sal del mismo.

En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, el número de átomos de carbono en el poliol es 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 6, o 4 a 5, por ejemplo, y el número de grupos hidroxilo es aproximadamente 1 por átomo de carbono, o 1 por 2 átomos de carbono, o 1 por 3 átomos de carbono, o 2 por 2 átomos de carbono, o 2 por 3 átomos de carbono, por ejemplo, siendo el número total de grupos hidroxilo en el poliol aproximadamente 2, o aproximadamente 3, o aproximadamente 4, o aproximadamente 5, o aproximadamente 6, o aproximadamente 7, o aproximadamente 8, por ejemplo. En algunos ejemplos, a modo de ilustración y no limitación, el poliol es un poliol C₂, o C₃, o C₄, o C₅, o C₆ que comprende 2 grupos hidroxilo o 3 grupos hidroxilo, o 4 grupos hidroxilo, o 5 grupos hidroxilo, o 6 grupos hidroxilo tal como, a modo de ilustración y no limitación, etilenglicol, propilenglicol, glicerol, eritritol, xilitol, ribitol y sorbitol, por ejemplo. El poliol puede ser un único

compuesto o una combinación de dos o más polioles que tienen las propiedades anteriormente mencionadas. En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, el poliol es glicerol.

5 El agente quelante y el poliol están presentes en la combinación en cantidades que son eficaces para estabilizar el receptor y/o para potenciar la sensibilidad del receptor. La cantidad del agente quelante y la cantidad del poliol dependen de uno o más de la naturaleza y cantidad del receptor, la naturaleza del agente quelante, la naturaleza del poliol, y la naturaleza de la formulación líquida, por ejemplo. En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, una cantidad eficaz del agente quelante en la combinación puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, o aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, o aproximadamente 10 mM a aproximadamente 15 mM, o aproximadamente 15 mM a aproximadamente 20 mM o aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mM.

15 En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, una cantidad eficaz del poliol en la combinación puede ser, por ejemplo, aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 %, o aproximadamente 5 % a aproximadamente 40 %, o aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 %, o aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 %, o aproximadamente 5 % a aproximadamente 10 %, o aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 %, o aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 %, o aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 %, o aproximadamente 10 % a aproximadamente 20 %, por ejemplo. Los porcentajes anteriores son en peso del poliol en un medio líquido.

20 Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a composiciones que comprenden un medio acuoso, un receptor, un agente quelante en una cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, y un poliol C2-C6 en una cantidad de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 % en peso.

25 En algunos ejemplos, el medio líquido o la solución líquida es un medio acuoso, que puede ser únicamente agua o puede incluir aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 80 %, o 0,1 % a aproximadamente 60 %, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 %, o aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 30 %, o aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 %, o aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 %, o aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 %, o aproximadamente 1 % a aproximadamente 80 %, o 1 % a aproximadamente 60 %, o aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 %, o aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 %, o aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, o aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 %, o aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 %, o aproximadamente 5 % a aproximadamente 80 %, o 5 % a aproximadamente 60 %, o aproximadamente 5 % a aproximadamente 40 %, o aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 %, o aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 %, o aproximadamente 5 % a aproximadamente 10 %, por ejemplo, de un codisolvente. Los porcentajes anteriores son en volumen del medio. El codisolvente puede ser, por ejemplo, pero no se limita a, un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcohol, un éster, un éter, una amida o una amina.

40 El pH para el medio estará normalmente 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, o en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, o aproximadamente 7, por ejemplo. Se pueden usar diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH del medio. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris y barbital, por ejemplo. El tampón particular empleado no es crítico, pero en una composición individual se puede preferir uno u otro tampón. También se pueden incluir en el medio diversos materiales auxiliares. Por ejemplo, además de los tampones, el medio puede contener conservantes, bloqueantes de unión no específica y bloqueantes de interferencia heterófilos para prevenir resultados falsos, y tensioactivos, por ejemplo.

45 La solución líquida del receptor, el agente quelante y el poliol C2-C6 se pueden mantener a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 40 °C, o aproximadamente 2 °C a aproximadamente 30 °C, o aproximadamente 2 °C a aproximadamente 20 °C, o aproximadamente 5 °C a aproximadamente 40 °C, o aproximadamente 5 °C a aproximadamente 30 °C, o aproximadamente 5 °C a aproximadamente 20 °C, o aproximadamente 5 °C a aproximadamente 10 °C, o aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C, o aproximadamente 10 °C a aproximadamente 30 °C, o aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, o aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C, o aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C, o aproximadamente 15 °C a aproximadamente 20 °C, o aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, o aproximadamente temperatura ambiente, por ejemplo. La solución líquida del receptor mantiene buena estabilidad durante al menos aproximadamente 1 semana, o al menos aproximadamente 1 mes, o al menos aproximadamente 6 meses, o al menos aproximadamente 1 año, o al menos aproximadamente 1,5 años, o al menos aproximadamente 2 años, por ejemplo. La expresión "buena estabilidad", como se usa en el presente documento, significa que el receptor no pierde más de aproximadamente 40 %, o más de aproximadamente 30 %, o más de aproximadamente 20 %, o más de aproximadamente 10 %, o más de aproximadamente 5 % de su actividad durante un periodo de 12 meses o que el receptor tiene una semivida de al menos aproximadamente 12 meses, o al menos aproximadamente

15 meses, o al menos aproximadamente 20 meses durante el almacenamiento a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 10 °C.

5 Las composiciones según los principios descritos en el presente documento se pueden emplear en métodos de detectar en una muestra un analito de unión al receptor, que se refiere a una molécula que se une al receptor. La muestra a analizar es una que se sospecha que contiene uno o más analitos de unión al receptor. Las muestras son preferentemente de seres humanos o animales e incluyen, pero no se limitan a, líquidos biológicos tales como
10 sangre completa, suero, plasma, esputo, líquido linfático, semen, moco vaginal, heces, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, excrementos, líquido cefalorraquídeo cerebral, lágrimas y moco, por ejemplo, y tejido biológico tal como pelo, piel, secciones o tejidos cortados de órganos u otras partes del cuerpo, por ejemplo. En muchos casos, la muestra es sangre completa, plasma o suero y, en un ejemplo particular, la muestra es suero. La muestra puede o puede no ser pretratada para retirar restos de unión endógenos que se unen al analito de unión al receptor o para liberar el analito de unión al receptor de sustancias de unión endógenas.

15 La muestra se puede preparar en cualquier medio conveniente que no interfiera con un ensayo; generalmente se emplea un medio acuoso. La naturaleza del medio se trata más abajo en más detalle. Dependiendo de la naturaleza de la muestra, se pueden llevar a cabo uno o más pretratamientos en la muestra tales como, a modo de ilustración y no limitación, pretratamiento con un agente hemolítico, pretratamiento con un agente de liberación, pretratamiento con un desplazador que desplaza el analito de unión al receptor unido de sus componentes de unión endógenos tales como proteínas, y detergente(s) hemolítico(s) que ayudan en el lisado de glóbulos sanguíneos para liberar un analito de unión al receptor de glóbulos sanguíneos, por ejemplo. Cualquiera de los agentes anteriores está presente
20 en una concentración o cantidad suficiente para lograr la función o efecto deseado, tal como, por ejemplo, hemólisis o liberación de analito de unión al receptor de sustancias de unión endógenas.

Tras el pretratamiento anterior, si lo hay, se añaden al medio reactivos para determinar uno o ambos de la presencia y cantidad del analito de unión al receptor en la muestra. La naturaleza de los reactivos depende del tipo particular de ensayo a realizar. En general, el ensayo es un método para la determinación o medición de uno o ambos de la
25 presencia y cantidad de un analito de unión al receptor. Diversos métodos de ensayo se tratan a continuación a modo de ilustración y no limitación.

En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, los reactivos de ensayo incluyen al menos un receptor para el analito de unión al receptor. El receptor está presente en una composición líquida o solución líquida según los principios descritos en el presente documento y una porción de la composición líquida se
30 combina en el medio de ensayo. Como se ha mencionado anteriormente, los receptores tratados con una combinación de un poliol y un agente quelante según los principios descritos en el presente documento también presentan sensibilidad potenciadas con respecto a los receptores que no se trataron de este modo. La expresión "sensibilidad potenciada" significa que la sensibilidad lograda en un ensayo para un analito de unión al receptor que emplea un receptor tratado según los principios descritos en el presente documento es al menos aproximadamente
35 10 % superior, o al menos aproximadamente 25 % superior, o al menos aproximadamente 50 % superior, o al menos aproximadamente 75 % superior a la sensibilidad de un ensayo usando un receptor no tratado según los principios descritos en el presente documento.

Además de uno o más receptores, los reactivos de ensayo pueden incluir uno o más anticuerpos específicos por un receptor, o por un analito de unión al receptor, otro anticuerpo, o una molécula pequeña, por ejemplo. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Dichos anticuerpos se pueden preparar por técnicas que se conocen bien en la técnica, tales como inmunización de un hospedador y recogida de sueros (policlonales) o preparando líneas celulares híbridas continuas y recogiendo la proteína secretada (monoclonal) o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican al menos las
40 secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmento de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3 e IgM, por ejemplo. Los fragmentos de los mismos pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂ y Fab', por ejemplo. Además, se pueden usar agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos, cuando corresponda, mientras se mantenga la afinidad de unión por una molécula particular.

45 Otros reactivos se incluyen en un medio de ensayo dependiendo de la naturaleza del ensayo a realizar. Dichos ensayos normalmente implican reacciones entre componentes de unión tales como un receptor y un analito de unión al receptor y también pueden incluir la unión entre un anticuerpo y un componente de unión correspondiente tal como, por ejemplo, un receptor, dependiendo del formato de ensayo particular elegido.

50 Como se trata anteriormente, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes por la otra en comparación con sustancialmente menos reconocimiento de otras moléculas. Por otra parte, la unión no específica implica la unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de las estructuras superficiales específicas. La unión no específica puede resultar de varios factores que incluyen interacciones hidrófobas entre moléculas. En algunos ejemplos, los componentes de unión son anticuerpos.

Discusión general de ensayos

La presente divulgación tiene aplicación para muchos tipos de ensayos que se pueden emplear para determinar uno o ambos de la presencia y cantidad de uno o más analitos que incluyen, por ejemplo, analitos de unión al receptor, en una muestra que se sospecha que contiene dicho analito. Los reactivos de receptor según los principios descritos en el presente documento se pueden emplear en muchos formatos de ensayo que se diseñan para reactivos de anticuerpo. Los ensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los ensayos que implican reactivos no marcados comprenden normalmente la formación de complejos relativamente grandes que implican uno o más receptores. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitación y aglutinación y técnicas de dispersión de la luz correspondientes tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de receptor. Para ensayos no marcados, se pueden emplear una composición según los principios descritos en el presente documento donde la composición comprende un conjugado de un analito de unión al receptor y un soporte tal como, por ejemplo, una partícula. En un ejemplo, el analito de unión al receptor en una muestra compite con el conjugado analito de unión al receptor-soporte de forma que cuando mayor sea la cantidad de analito de unión al receptor en una muestra, menos será la cantidad de un precipitado formado por aglutinación. En algunos ejemplos, el analito de unión al receptor es un anticuerpo tal como, por ejemplo, un auto-anticuerpo que puede estar presente en una muestra y se emplea un conjugado según los principios descritos en el presente documento que tiene un analito de unión al receptor unido a un soporte en partículas. La presencia del anticuerpo en la muestra da como resultado la aglutinación del conjugado reactivo.

Los inmunoensayos marcados incluyen inmunoensayos de enzima, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayo, ensayos de inhibición y luminiscencia inducida, ensayo de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo. En un ejemplo de un enfoque de ensayo marcado, un conjugado que tiene un analito de unión al receptor unido a una marca tal como, por ejemplo, una enzima, puede competir con el analito de unión al receptor en una muestra de forma que cuanto mayor sea la cantidad de analito de unión al receptor en la muestra, menos será la cantidad de señal de la marca. En otro ejemplo de un enfoque de ensayo marcado, un conjugado que tiene un receptor unido a una marca tal como, por ejemplo, una enzima, se puede emplear para unirse con el analito de unión al receptor en una muestra y se emplea un segundo receptor para el analito de unión al receptor para formar un complejo de sándwich. Se detecta una cantidad de señal de la marca y se relaciona con la cantidad del analito de unión al receptor en la muestra de forma que cuanto mayor sea la cantidad de analito de unión al receptor en la muestra, mayor será la cantidad de señal de la marca.

Como se ha mencionado anteriormente, en muchos de los ensayos tratados en el presente documento, se emplea una marca y es en muchos ejemplos parte de un conjugado de analito de unión al receptor. Por otra parte, la marca puede ser parte de un reactivo independiente del conjugado de analito de unión al receptor. La marca es normalmente parte de un sistema productor de señales ("sps"). La naturaleza de la marca depende del formato de ensayo particular. Como se trata anteriormente, el sistema productor de señales incluye normalmente uno o más componentes, siendo al menos un componente una marca detectable, que genera una señal detectable que se refiere a la cantidad de marca unida y/o no unida, es decir, la cantidad de marca unida o no unida al analito de unión al receptor que se detecta o a un agente que refleja la cantidad de analito de unión al receptor que va a detectarse.

La marca es cualquier molécula que produzca o se pueda inducir para producir una señal. La marca puede ser un poli(aminoácido), o proteína, o no poli(aminoácido), isotópico o no isotópico, normalmente no isotópico, y puede ser un catalizador, tal como una enzima, un polinucleótido que codifica un catalizador, promotor, colorante, molécula fluorescente, molécula quimioluminiscente, coenzima, sustrato de enzima, grupo radiactivo, una molécula orgánica pequeña, secuencia de polinucleótidos amplificable, una partícula tal como partícula de látex o carbono, sol metálico, cristalita, liposoma, célula, etc., que puede o puede no ser adicionalmente marcada con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, por ejemplo. En algunos ejemplos, las marcas son radioisotópicas, luminiscentes, particuladas o enzimáticas y pueden ser, por ejemplo, un agente fluorescente, radiomarca, enzima, agente quimioluminiscente o fotosensibilizador. Así, por ejemplo, para las marcas anteriores, la señal se detecta y/o mide detectando actividad enzimática, luminiscencia, absorbancia de luz o radiactividad, según lo requiera el caso.

El término "marcas no de poli(aminoácido)" se refiere a las marcas que no son proteínas. Una marca no de poli(aminoácido) puede ser un miembro de un sistema productor de señales. La marca no de poli(aminoácido) es capaz de ser detectada directamente o es detectable mediante una reacción de unión específica que produce una señal detectable. Las marcas no de poli(aminoácido) generalmente son radioisotópicas, luminiscentes (tales como, por ejemplo, ésteres de acridinio), particuladas (tal como, por ejemplo, partículas magnéticas que se pueden separar las unidas de las no unidas, partículas de látex que se pueden medir por turbidez y nefelometría, y perlas de quimioluminiscencia (por ejemplo, quimioperlas LOCI), por ejemplo. La marca puede ser isotópica o no isotópica, normalmente no isotópica, y pueden ser un polinucleótido que codifica un catalizador, promotor, colorante, molécula fluorescente, molécula quimioluminiscente, coenzima, sustrato enzimático, grupo radiactivo, una molécula orgánica pequeña, secuencia de polinucleótidos amplificable, una partícula tal como, por ejemplo, partícula de látex o carbono, sol metálico, cristalita, liposoma, o célula, que puede o puede no ser adicionalmente marcada con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, por ejemplo. Las marcas de poli(aminoácido) incluyen, a modo de ilustración y no limitación, péptidos y proteínas tales como, por ejemplo, enzimas, por ejemplo.

Los ejemplos de marcas incluyen, a modo de ilustración y no limitación, enzimas tales como fosfatasa alcalina ("AP"), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH") y peroxidasa de rábano picante; ribozima; un sustrato para una replicase tal como QB replicasa; promotores; colorantes; agentes fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina; complejos tales como los preparados a partir de CdSe y ZnS presentes en nanocristales semiconductores conocidos como puntos cuánticos; agentes quimioluminiscentes tales como isoluminol; sensibilizadores; coenzimas; sustratos enzimáticos; radiomarcas tales como ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴C, ³H, ⁵⁷Co y ⁷⁵Se; partículas tales como partículas de látex, partículas de carbono, partículas metálicas que incluyen partículas magnéticas, por ejemplo, partículas de dióxido de cromo (CrO₂), y similares; sol metálico; cristalita; liposomas; células, etc., que pueden ser adicionalmente marcadas con un colorante, catalizador u otro grupo detectable. Las enzimas adecuadas y coenzimas se desvelan en Litman, et al., patente de EE.UU. N° 4.275.149, columnas 19-28, y Boguslaski, et al., patente de EE.UU. N° 4.318.980, columnas 10-14; agentes fluorescentes y agentes quimioluminiscentes adecuados se desvelan en Litman, et al., patente de EE.UU. N° 4.275.149, en las columnas 30 y 31.

La marca puede producir directamente una señal y, por tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Las numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo, agentes fluorescentes, son capaces de absorber luz ultravioleta y visible, donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva hasta un estado excitado de energía. Esta energía absorbida se disipa entonces por emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otras marcas que producen directamente una señal incluyen isótopos radiactivos y colorantes.

Alternativamente, la marca puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema productor de señales incluiría entonces todos los componentes requeridos para producir una señal medible. Dichos otros componentes pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, secuestrantes, iones metálicos, y una sustancia de unión específica requerida para la unión de sustancias generadoras de señales.

En algunos ejemplos, las enzimas de interés como proteínas de marca son enzimas de oxidación-reducción, particularmente deshidrogenasas tales como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, etc., y enzimas que implican la producción de peróxido de hidrógeno y el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante en un colorante. Las combinaciones particulares incluyen sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasa, u oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea el peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, es decir, una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa o microperoxidasa. Se conocen en la técnica combinaciones de enzima adicionales. Cuando se usa una única enzima como marca, otras enzimas pueden encontrar uso tales como hidrolasas, transferasas y oxidoreductasas, preferentemente hidrolasas tales como fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa. Alternativamente, se pueden usar luciferasas tales como luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana. Las co-enzimas ilustrativas que encuentran uso incluyen NAD[H], NADP[H], piridoxal fosfato, FAD[H], FMN[H], etc., normalmente coenzimas que implican reacciones de ciclación. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.318.980.

Un grupo general de ensayos que se pueden emplear incluye ensayos usando una concentración limitada de receptor. Otro grupo de ensayos implica el uso de un exceso de uno o más de los principales reactivos tales como, por ejemplo, un exceso de un receptor para el analito de unión al receptor. Otro grupo de ensayos son ensayos homogéneos libres de separación en los que los reactivos marcados modulan la señal de marca tras las reacciones de unión analito de unión al receptor-receptor. Otro grupo de ensayos incluye ensayos competitivos limitados a reactivo de receptor marcado para un analito de unión al receptor. En este tipo de ensayo, un conjugado de receptor-soporte, según los principios descritos en el presente documento, está presente en una cantidad limitada constante. El reparto de una marca entre el analito de unión al receptor inmovilizado y el analito de unión al receptor libre depende de la concentración de analito de unión al receptor en la muestra.

Los ensayos se pueden realizar ya sea sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los receptores según los principios descritos en el presente documento se pueden emplear en muchos formatos de inmunoensayo. En un ensayo homogéneo después de que se hayan combinado todos los reactivos, se determina la señal y se relaciona con la cantidad de analito de unión al receptor en la muestra. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican por el ensayo EMIT® (Syva Company, San Jose, CA) desvelado en Rubenstein, et al., patente de EE.UU. N° 3.817.837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los desvelados en Ullman, et al., patente de EE.UU. N° 3.996.345, columna 17, línea 59, a columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") tales como los desvelados en Maggio, et al., patente de EE.UU. N° 4.233.402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") como se desvela, por ejemplo, en, entre otros, la patente de EE.UU. N° 5.354.693; etc.

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por modulador enzimático ("EMMIA") tratado por Ngo y Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116:285-288; el inmunoensayo de fluorescencia con sustrato marcado ("SLFIA") desvelado por Oellerich, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1984) 22:895-904; los inmunoensayos de donantes

enzimáticos combinados ("CEDIA") desvelados por Khanna, et al., Clin. Chem. Acta (1989) 185:231-240; inmunoensayos homogéneos de partículas marcadas tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrica potenciada por partículas ("PETINIA"), inmunoensayo turbidimétrico potenciado por partículas ("PETIA"), etc.; y similares.

5 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"); luminoinmunoensayos ("LIA"); etc. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos inmunosensores que implican la
10 monitorización de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de una superficie para inmovilizar anticuerpos tras la unión de un analito de unión al receptor. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensores ópticos, ensayos de inmunosensores acústicos, ensayos de inmunosensores semiconductores, ensayos de inmunosensores transductores electroquímicos, ensayos de inmunosensores potenciométricos y ensayos de electrodos amperométricos.

En un ejemplo de un ensayo enzimático para un analito de unión al receptor, se combina una muestra que se
15 sospecha que contiene el analito de unión al receptor en un medio acuoso ya sea simultáneamente o secuencialmente con un receptor capaz de reconocer el analito de unión al receptor y un reactivo que comprende un conjugado del analito de unión al receptor y una enzima. El receptor se añade de una solución líquida del receptor estabilizado según los principios descritos en el presente documento. Se añade un sustrato para la enzima, que da como resultado la formación de un producto cromogénico o fluorogénico tras la reacción catalizada por enzima. Los
20 ejemplos, a modo de ilustración y no limitación, de enzimas son glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina, pero se pueden emplear otras enzimas. El analito de unión al receptor y el resto de analito de unión al receptor del conjugado enzimático compiten por los sitios de unión sobre el receptor. Entonces se determina la actividad enzimática en el medio, normalmente por medios espectrofotométricos, y se compara con la actividad enzimática determinada cuando se prueban calibradores o muestras de referencia, en los que está presente una cantidad conocida del analito de unión al receptor. Normalmente, los calibradores se prueban de un modo similar a
25 la prueba de la muestra que se sospecha que contiene los analitos de unión al receptor. Los calibradores contienen concentraciones diferentes, pero conocidas, del analito de unión al receptor a determinar. En la mayoría de los ejemplos, los intervalos de concentración presentes en los calibradores abarcan el intervalo de concentraciones de analito de unión al receptor sospechoso en muestras desconocidas.

Los ensayos heterogéneos normalmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no
30 competitivos. Se desvelan una variedad de formatos de ensayo competitivos y no competitivos en Davalian, et al., patente de EE.UU. Nº 5.089.390, columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9. En un tipo de ensayo competitivo, un soporte, como se trata en el presente documento, que tiene un receptor para el analito de unión al receptor unido al mismo se pone en contacto con un medio que contiene la muestra que se sospecha que contiene el analito de unión al receptor y un reactivo que es un conjugado del analito de unión al receptor y una enzima. El reactivo de soporte
35 con el receptor unido está en una solución líquida según los principios descritos en el presente documento. Después de la separación del soporte y el medio, la actividad enzimática del soporte o el medio se determina por técnicas convencionales y se relaciona con uno o ambos de la presencia y cantidad de analito de unión al receptor en la muestra. En ciertos ejemplos, se pueden emplear una segunda enzima, además de la enzima del conjugado de enzima. Las enzimas del par de enzimas están relacionadas en que un producto de la primera enzima sirve de sustrato para la segunda enzima.
40

Otro ejemplo de un formato de ensayo es un ensayo de captura. En este formato de ensayo, el receptor para el analito de unión al receptor se une covalentemente a una partícula tal como, por ejemplo, una partícula magnética. Alternativamente, el receptor se puede unir a la partícula no covalentemente tal como, por ejemplo, por un anticuerpo para el receptor donde el anticuerpo se une covalentemente a la partícula. Este reactivo de receptor-partícula se almacena en una solución líquida según los principios descritos en el presente documento antes de su
45 uso en el ensayo. La muestra se incuba con el reactivo de receptor-partícula para permitir que el analito de unión al receptor en la muestra se una al receptor para el analito de unión al receptor. Opcionalmente, las partículas se separan del medio de ensayo y se lavan. Un reactivo que comprende un conjugado de un segundo receptor para el analito de unión al receptor, receptor que está unido a una enzima, se incuba con las partículas. Este segundo reactivo de receptor-partícula se puede almacenar en una solución líquida según los principios descritos en el presente documento antes de su uso en el ensayo. Después de lavar, se mide la cantidad de enzima que está unida a las partículas separadas y se relaciona directamente con uno o ambos de la presencia y cantidad del analito de unión al receptor en la muestra.
50

En algunas realizaciones se pueden utilizar ensayos multi-analito donde el analito de unión al receptor puede ser el
55 sujeto de detección junto con uno o varios de otros analitos tales como otros analitos de unión al receptor, por ejemplo. Dichos sistemas multi-analito se describen, por ejemplo, en Loor, et al., J. Anal. Toxicol. 12: 299 (1988).

Los ensayos tratados anteriormente normalmente se llevan a cabo en un medio acuoso tamponado a un pH moderado, que generalmente proporciona sensibilidad óptima del ensayo. El pH para el medio de ensayo puede estar 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 será normalmente un compromiso entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específica, el óptimo de pH para otros reactivos del ensayo tales como miembros del sistema productor de señales, por ejemplo.

5 Se pueden usar diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital, y similares. El tampón particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual se pueden preferir uno u otro tampón. Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en los métodos anteriores. Por ejemplo, además de tampones, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. Frecuentemente, además de estos aditivos, se
10 pueden incluir proteínas, tales como albúminas; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; y potenciadores de la unión, por ejemplo.

Se pueden aplicar uno o más periodos de incubación al medio de ensayo en uno o más intervalos que incluyen cualquier intervalo entre adiciones de diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio se incuba normalmente a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que ocurra la unión de diversos componentes de los reactivos. Se emplean normalmente temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y normalmente temperatura constante, preferentemente, temperatura ambiente, durante el periodo de la medición. Las temperaturas de incubación normalmente oscilan desde aproximadamente 5 °C hasta aproximadamente 99 °C o desde aproximadamente 15 °C hasta aproximadamente 70 °C o desde aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 45 °C, por ejemplo. El periodo de tiempo para la incubación es aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente
15 24 horas, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos. El periodo de tiempo depende de la temperatura del medio y la tasa de unión de los diversos reactivos, que se determina por la constante de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de disociación. Las temperaturas durante las mediciones generalmente oscilarán desde aproximadamente 10 °C hasta aproximadamente 50 °C o desde
20 aproximadamente 15 °C hasta aproximadamente 40 °C, por ejemplo.

La concentración de analito de unión al receptor que se puede ensayar generalmente varía desde aproximadamente 10^{-5} hasta aproximadamente 10^{-17} M, más normalmente desde aproximadamente 10^{-6} hasta aproximadamente 10^{-14} M. Consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (con respecto a la cantidad de analito de unión al receptor presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración de analito normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.
25

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente serán determinadas por el intervalo de concentración de interés del analito de unión al receptor y la naturaleza del ensayo, por ejemplo. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo a lo largo del intervalo. Es decir, una variación en concentración de analito de unión al receptor que es de significancia debe proporcionar una diferencia de señal medible con exactitud. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema productor de señales y la naturaleza de los analitos de unión al receptor normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.
30

Mientras que el orden de adición se puede variar ampliamente, habrá ciertas preferencias que dependen de la naturaleza del ensayo. El orden de adición más simple 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, los reactivos se pueden combinar secuencialmente. En algunos ejemplos, se puede implicar una etapa de incubación posterior a cada adición como se trata anteriormente.
35

Etapas de examen

45 En una siguiente etapa de un método de ensayo, el medio se examina para la presencia de un complejo que comprende el analito de unión al receptor y el receptor para el analito de unión al receptor. La presencia y/o cantidad del complejo indica la presencia y/o cantidad del analito de unión al receptor en la muestra.

La expresión "medir la cantidad de un analito de unión al receptor" se refiere a la determinación cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa del analito de unión al receptor. Se considera que los métodos que son cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, así como todos los otros métodos para determinar el analito de unión al receptor, son métodos de medición de la cantidad del analito de unión al receptor. Por ejemplo, se considera que un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito de unión al receptor en una muestra que se sospecha que contiene el analito de unión al receptor, está dentro del alcance de la presente invención. Se contemplan los términos "detectar" y "determinar," así como otros sinónimos comunes de medir, dentro del alcance de la presente invención.
50

55 En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio. Uno o ambos de la

presencia y cantidad de la señal están relacionados con la presencia y/o cantidad del analito de unión al receptor en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza del sistema productor de señales. Como se trata anteriormente, existen numerosos métodos por los que una marca de un sistema productor de señales puede producir una señal detectable por medios externos, deseablemente por examen visual, e incluyen, por ejemplo, radiación electromagnética, electroquímica, calor, detección de radiactividad y reactivos químicos.

La activación de un sistema productor de señales depende de la naturaleza de los miembros del sistema productor de señales. Para los miembros de un sistema productor de señales que se activan con luz, el miembro se irradia con luz. Los expertos en la técnica sugerirán otros métodos de activación en vista de las divulgaciones en el presente documento. Para algunos sistemas productores de señales, no es necesario agente para activación, tal como los sistemas que implican una marca que es una marca radiactiva o una enzima, por ejemplo. Para sistemas enzimáticos, puede ser necesaria la adición de un sustrato y/o un cofactor.

El examen de la presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente una etapa en 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, fluorímetro, espectrómetro de absorción, luminómetro, quimioluminómetro, actinómetro, o instrumento fotográfico, por ejemplo. La presencia y cantidad de señal detectada está relacionada con la presencia y cantidad del analito de unión al receptor presente en una muestra. Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían desde aproximadamente 10 °C hasta aproximadamente 70 °C o desde aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 45 °C, o aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 25 °C, por ejemplo. En un enfoque se forman curvas patrón usando concentraciones conocidas de los analitos de unión al receptor a cribar. Como se trata anteriormente, también se pueden usar calibradores y otros controles.

Realizaciones específicas de ensayos

Los siguientes ejemplos describen ejemplos específicos según los principios descritos en el presente documento a modo de ilustración y no limitación y están previstos simplemente para describir, y no limitar, el alcance de la presente divulgación y las reivindicaciones adjuntas. La selección de autoanticuerpos de TSH como analito de unión al receptor y primera y segunda quimeras de receptor de TSH también es a modo de ilustración y no limitación, puesto que los ejemplos según los principios descritos en el presente documento tienen aplicación general para la detección de analitos de unión al receptor en general y el uso de receptores de todos los tipos diferentes como se trata anteriormente.

En un ejemplo según los principios descritos en el presente documento, el ensayo empleado es un ensayo de luminiscencia inducido, que se describe en la patente de EE.UU. N° 5.340.716 (Ullman, et al.). Los reactivos incluyen dos reactivos de perlas de látex y una segunda quimera de receptor de TSH biotinilada para los autoanticuerpos de TSH. El primer reactivo de perlas es un conjugado en donde una perla de látex que contiene un colorante quimioluminiscente se une ya sea covalentemente o no covalentemente a una primera quimera de receptor de TSH para los autoanticuerpos de TSH. En algunos ejemplos, tanto el primer reactivo de quimera de receptor de TSH como el segundo reactivo de quimera de receptor de TSH se guardan por separado en soluciones líquidas según los principios descritos en el presente documento. El segundo reactivo de perlas está recubierto con estreptavidina y contiene un colorante fotosensibilizador. En una primera etapa, se incuba una muestra que se sospecha que contiene autoanticuerpos de TSH con la segunda quimera de receptor de TSH biotinilada para autoanticuerpos de TSH, que permite que los autoanticuerpos de TSH de la muestra saturen una fracción de la segunda quimera de receptor de TSH biotinilada donde la fracción se relaciona directamente con la concentración de autoanticuerpos de TSH en el medio de ensayo. En una segunda etapa, se añade el primer reactivo de perlas, que como se ha mencionado anteriormente se une a una primera quimera de receptor de TSH para los autoanticuerpos de TSH, y conduce a la formación de complejos de perlas-segunda quimera de receptor de TSH biotinilada con la fracción no saturada de la segunda quimera de receptor de TSH biotinilada. Entonces se añade el segundo reactivo de perlas y se une a la biotina para formar complejos de pares de perlas. Cuando se ilumina por luz a 680 nm, el segundo reactivo de perlas convierte el oxígeno disuelto en la solución de reacción en la forma de oxígeno singlete más energética. En los pares de perlas, el oxígeno singlete difunde en el primer reactivo de perlas, desencadenando así una reacción quimioluminiscente. La señal quimioluminiscente resultante se mide a 612 nm y es una función de la concentración de autoanticuerpos de TSH en la muestra. La cantidad de esta señal se relaciona con la presencia y o cantidad de autoanticuerpos de TSH en la muestra.

En otro ejemplo según la presente divulgación, se mezcla una muestra de prueba que se sospecha que contiene autoanticuerpos de TSH con un reactivo (Reactivo A) y una perla seca que tiene un anticuerpo para la quimera de receptor de TSH unido a la perla y una primera quimera de receptor de TSH unido al anticuerpo de la perla. La muestra, perla y Reactivo A se incuban durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para que algunos de los autoanticuerpos de TSH en la muestra se unan a la quimera de receptor de TSH. Se separa el reactivo líquido de la perla por centrifugación y luego se lava. La perla lavada se incuba con Reactivo B que contiene una segunda quimera de receptor de TSH unida a fosfatasa alcalina (receptor de detección) durante un periodo de tiempo y en condiciones para las que el receptor de detección se une a los autoanticuerpos de TSH unidos a la primera quimera

de receptor de TSH de la perla. Se separa la perla del medio de ensayo y se lava. Entonces, la perla se incuba con una solución de sustrato que comprende un sustrato para fosfatasa alcalina y entonces se examina el medio para uno o ambos de la presencia y cantidad de señal, que se mide con un luminómetro con el tiempo. La presencia y/o cantidad de señal está relacionada con la presencia y/o cantidad de autoanticuerpos de TSH en la muestra original.

5 Kits

Los reactivos para realizar un ensayo particular pueden estar presentes en un kit útil para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito de unión al receptor. En un ejemplo según los principios descritos en el presente documento, un kit comprende en combinación envasada un receptor para un analito de unión al receptor y otros reactivos para realizar un ensayo para la detección del analito de unión al receptor donde la naturaleza de dichos reactivos depende del formato de ensayo particular. El receptor reactivo está presente en una solución líquida que comprende un agente quelante y un poliol según los principios descritos en el presente documento. El kit también puede comprender un agente de receptor de detección que comprende una marca. El agente de receptor de detección está presente en una solución líquida que comprende un agente quelante y un poliol según los principios descritos en el presente documento. Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o se pueden combinar diversos reactivos en uno o más receptores dependiendo de la reactividad cruzada y estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos envasados por separado para realizar un ensayo tal como reactivos de unión adicionales y reactivos auxiliares tales como un reactivo de sustrato enzimático, por ejemplo.

Se pueden variar ampliamente las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits para proporcionar concentraciones de los reactivos que sustancialmente optimizan las reacciones que se necesita que ocurran durante el método de ensayo y además para optimizar sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Los reactivos distintos de los que contienen un receptor según los principios descritos en el presente documento se pueden proporcionar en circunstancias apropiadas como un polvo seco, normalmente liofilizado, que incluye excipientes, que tras la disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo según la presente invención. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método según la presente invención como se ha descrito anteriormente.

Definiciones

La expresión "al menos", como se usa en el presente documento, significa que el número de artículos especificados puede ser igual o superior al número citado.

30 La expresión "aproximadamente", como se usa en el presente documento, significa que el número citado se puede diferenciar por más o menos 10 %; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un intervalo de 4,5 a 5,5.

Las designaciones "primer" y "segundo" se usan únicamente con el fin de diferenciar entre dos artículos tales como, por ejemplo, "primer recipiente" y "segundo recipiente", y no pretenden implicar ninguna secuencia u orden o importancia a un artículo con respecto al otro.

35 Ejemplos

Los siguientes ejemplos son a modo de ilustración y no limitación del alcance de la presente divulgación y las reivindicaciones adjuntas. Se pueden idear numerosas modificaciones y composiciones, métodos y sistemas alternativos sin apartarse del espíritu y alcance de la presente divulgación. A menos que se indique lo contrario, los materiales en los experimentos a continuación se pueden comprar de Sigma-Aldrich Chemical Company, St. Louis MO. Las partes y porcentajes son en peso, a menos que se indique lo contrario.

Los ejemplos de procedimiento describen un ensayo y utilizan un kit para la detección cuantitativa de inmunoglobulinas estimulantes de la tiroides (TSI), que son autoanticuerpos para el receptor de TSH. La medición de TSI en muestras de suero se usa como una ayuda en la evaluación de pacientes que se sospecha que tienen enfermedad de Graves. El kit consiste en una perla seca, un tampón de incubación de muestra (Reactivo A) y un tampón de detección (Reactivo B) que contiene una quimera de receptor de TSH (como se desvela en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2009/0325310 A1 publicada el 31 de diciembre de 2009) conjugado con AP.

Abreviaturas:

L = litro(s)
 UI = unidades internacionales
 50 KCPS = kilorecuento(s) por segundo
 Tampón citrato = citrato de sodio 100 mM, NaCl 100 mM, acetato de magnesio 10 mM, cloruro de cinc 1 mM, 0,5 % de BSA, 0,1 % IgG de ratón, 0,2 % de PLURONIC® F68, 10 % de glicerol, pH 6,0-6,8

BSA = albúmina de suero bovino

IgG = inmunoglobulina

MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

5 Tampón MES = MES 100 mM, NaCl 100 mM, acetato de magnesio 10 mM, cloruro de cinc 1 mM, 0,5 % de BSA, 0,1 % de IgG de ratón, 0,2 % de PLURONIC® F68, 10 % de glicerol, pH 6,0-6,8

Tampón PIPES = PIPES 100 mM, NaCl 100 mM, acetato de magnesio 10 mM, cloruro de cinc 1 mM, 0,5 % de BSA, 0,1 % de IgG de ratón, 0,2 % de PLURONIC® F68, 10 % de glicerol, pH 6,0-6,8

Ejemplo 1

Recubrimiento de receptor de TSH sobre perlas

10 Se incuban perlas de poliestireno durante la noche con una solución de tampón (carbonato sódico 100 mM, cloruro sódico 150 mM, 0,1 % de azida de sodio, pH 9) de un anticuerpo monoclonal (mAb) con receptor de TSH. Tras los lavados con el mismo tampón para retirar el exceso de mAb, se incuban las perlas durante dos horas con una solución de tampón (PIPES 100 mM, 2 mg/ml de BSA, pH 6,8) de una quimera de receptor de TSH. Tras los lavados
15 de BSA, 5 % de sacarosa, pH 6,8, durante una hora, y luego se secan en una estufa de vacío.

Ejemplo 2

Efecto de HEDTA en el tampón de receptor de TSH

Se incubaron muestras de suero con cantidades variables de TSI nativa durante 30 minutos con una perla de poliestireno que tenía quimera de receptor de TSH humana inmovilizada sobre ella como se describe en el
20 Ejemplo 1. Tras los lavados centrífugos de las perlas, se añadió a las perlas una segunda quimera de receptor de TSH conjugada con fosfatasa alcalina (AP) en un tampón de detección (PIPES 100 mM, KCl 100 mM, 1 mg/ml de IgG de ratón, 5 mg/ml de BSA, 20 % de glicerol, pH 6,8) que contenía nada (Control) o HEDTA 1 mM. Después de 30 minutos de incubación, las perlas se lavaron otra vez, se añadió una solución de sustrato para AP y se detectó la
25 señal con un luminómetro. Se midió la señal cuando el tampón de detección se preparó primero y después de almacenamiento a 37 °C durante 2 días. La Tabla 1 muestra el porcentaje (%) de señal para las diversas muestras en el día 0 y día 2.

Tabla 1

Reactivo	Control	HEDTA 1 mM
TSI (UI/l)	Señal en el día 0 (KCPS)	
0	459	43
0,9	502	160
4,6	582	579
39,9	1474	3693
Recuentos de AP	5651	6275
	Señal en el día 2 (KCPS)	
0	247	41
0,9	239	134
4,6	252	364
39,9	236	2439
Recuentos de AP	5167	6548
	Recuperación de señal en el día 2 (%)	
0	54 %	97 %
0,9	47 %	84 %
4,6	43 %	63 %
39,9	16 %	66 %
Actividad de AP	91 %	104 %

30 El reactivo con HEDTA 1 mM mostró una unión no específica de casi un orden de magnitud más baja (señal para muestra de TSI cero) y señal dos veces mayor que el reactivo de control en el día 0 para la muestra con la mayor concentración de TSI. El reactivo que contiene HEDTA retuvo 66 % de su actividad en comparación con solo 16 % para el reactivo de control. La actividad enzimática de AP varió ligeramente entre 91 % y 104 % para los dos reactivos, que demuestra que la potenciada retención de actividad fue debida a la estabilidad mejorada del receptor de TSH en presencia de HEDTA según los principios descritos en el presente documento y no a la estabilidad mejorada de AP.

Ejemplo 3

Efecto de glicerol en el tampón de receptor de TSH

5 Se disolvió una quimera de receptor de TSH conjugada con AP (preparada como se ha descrito anteriormente) en tampones de detección (PIPES 0,1 M, acetato de magnesio 5 mM, cloruro de cinc 0,5 mM, HEDTA 1 mM, 5 mg/ml de BSA, 10 mg/ml de caseína, 2,5 µg/ml de anfotericina B, 0,2 mg/ml de sulfato de gentamicina) que contenían diversas concentraciones de glicerol. Los tampones de detección se evaluaron primero cuando se prepararon y después del almacenamiento a 37 °C durante 7 días. La Tabla 2 muestra el porcentaje (%) de señal inicial retenida después de 7 días para los diversos reactivos.

Tabla 2

TSI (UI/l)	Cantidades de glicerol			
	20 %	30 %	40 %	50 %
	Porcentaje (%) de respuesta retenida después de 7 días a 37 °C			
0,00	97 %	114 %	106 %	105 %
0,18	73 %	102 %	103 %	106 %
0,37	70 %	98 %	104 %	101 %
0,77	66 %	97 %	109 %	103 %
1,59	67 %	102 %	100 %	97 %
3,36	68 %	104 %	109 %	104 %
6,84	59 %	93 %	102 %	108 %
13,73	57 %	94 %	109 %	104 %
26,39	54 %	85 %	101 %	103 %
50,71	51 %	77 %	90 %	100 %
Promedio	66 %	96 %	103 %	103 %

10 La estabilidad del receptor de detección, como se indica por la señal retenida, mejoró desde 66 % hasta casi 100 % a medida que el contenido de glicerol del reactivo aumentó desde 20 % hasta 50 %.

Ejemplo 4

Efecto de la concentración de HEDTA en tampón de receptor de TSH

15 Se disolvió una quimera de receptor de TSH conjugada con AP (preparado como se ha descrito anteriormente) en un tampón (PIPES 0,1 M, acetato de magnesio 5 mM, cloruro de cinc 0,5 mM, 5 mg/ml de BSA, 10 mg/ml de caseína, 30 % de glicerol, 2,5 µg/ml de anfotericina B, 0,2 mg/ml de sulfato de gentamicina) que contenía diversas concentraciones de HEDTA. La Tabla 3 muestra la señal (KCPS) obtenida para las diversas muestras a diversas concentraciones de HEDTA.

Tabla 3

TSI (UI/l)	HEDTA (mM)					
	0,1	0,5	0,75	1,0	1,25	2
0	17	21	19	17	15	15
0,58	NA	925	929	953	872	957
9,26	288	1865	1939	2051	1883	1942
AP	16674	17192	14457	14704	14767	13772

20 La señal para la muestra de TSI más alta aumentó espectacularmente a medida que aumentó la concentración de HEDTA. La actividad de fosfatasa alcalina (AP) disminuyó ligeramente a mayor concentración de HEDTA, que demuestra que el aumento de señal a mayor concentración de HEDTA es debido a la mayor actividad retenida del receptor y no a la actividad de AP.

Ejemplo 5

25 Efecto de receptor de TSH en un tampón quelante

30 Se disolvió una quimera de receptor de TSH conjugada con fosfatasa alcalina (preparada como se ha descrito anteriormente) en diversos tampones (MES, PIPES, citrato) a diversos niveles de pH. Todas las formulaciones de tampón contuvieron 10 % de glicerol como se ha descrito anteriormente. La Fig. 1 muestra la señal para una muestra que tiene 33 UI/l de TSI. La señal varió desde 2000 KCPS hasta 4000 KCPS para los diversos tampones a diversos niveles de pH.

La Fig. 2 muestra el porcentaje de señal retenido después de guardar los tampones de detección con el receptor a 37 °C durante un día. Los tampones MES y PIPES, que no son según los principios descritos en el presente documento, retuvieron 25 % o menos de señal inicial independientemente del pH. El tampón citrato, según los principios descritos en el presente documento, retuvo entre 65 % y 80 % de la señal inicial.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de un anticuerpo de receptor de hormona estimulante de la tiroides en una muestra, comprendiendo dicho método:

5 proporcionar en combinación en un medio de ensayo una muestra que se sospecha que contiene un anticuerpo de receptor de hormona estimulante de la tiroides, una composición que comprende un medio acuoso, un receptor, un agente quelante en una cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM y un poliol C2-C6 en una cantidad de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 % en peso, en donde el receptor es una quimera de receptor de hormona estimulante de la tiroides,
10 en donde el receptor de hormona estimulante de la tiroides se une a un soporte y un segundo receptor de hormona estimulante de la tiroides se une a una marca,
examinar la combinación para la formación de un complejo que comprende la anticuerpo de receptor de hormona estimulante de la tiroides, la composición que comprende un medio acuoso, un receptor, un agente quelante en una cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM y un poliol C2-C6 en una cantidad de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 % en peso, en donde el receptor es una quimera de receptor de hormona estimulante de la tiroides,
15 en donde el receptor de hormona estimulante de la tiroides se une a un soporte y el segundo receptor de hormona estimulante de la tiroides se une a una marca, y
relacionar la presencia del complejo con uno o ambos de una presencia y una cantidad del anticuerpo de receptor de hormona estimulante de la tiroides en la muestra.

20 2. Un método de detección de un anticuerpo de receptor de hormona estimulante de la tiroides en una muestra, comprendiendo dicho método:

proporcionar en combinación en un medio de ensayo una muestra que se sospecha que contiene un anticuerpo de receptor de hormona estimulante de la tiroides, una composición que comprende un medio acuoso, un receptor, un agente quelante en una cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM y un poliol C2-C6 en una cantidad de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 % en peso, en donde el receptor es una quimera de receptor de hormona estimulante de la tiroides,
25 en donde el receptor de hormona estimulante de la tiroides se une a una marca y un segundo receptor de hormona estimulante de la tiroides se une a un soporte,
examinar la combinación para la formación de un complejo que comprende el anticuerpo de receptor de hormona estimulante de la tiroides, la composición que comprende un medio acuoso, un receptor, un agente quelante en una cantidad de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM y un poliol C2-C6 en una cantidad de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 % en peso, en donde el receptor es una quimera de receptor de hormona estimulante de la tiroides,
30 en donde el receptor de hormona estimulante de la tiroides se une a una marca y el segundo receptor de hormona estimulante de la tiroides se une a un soporte, y
35 relacionar la presencia del complejo con uno o ambos de una presencia y una cantidad de la anticuerpo de receptor de hormona estimulante de la tiroides en la muestra.

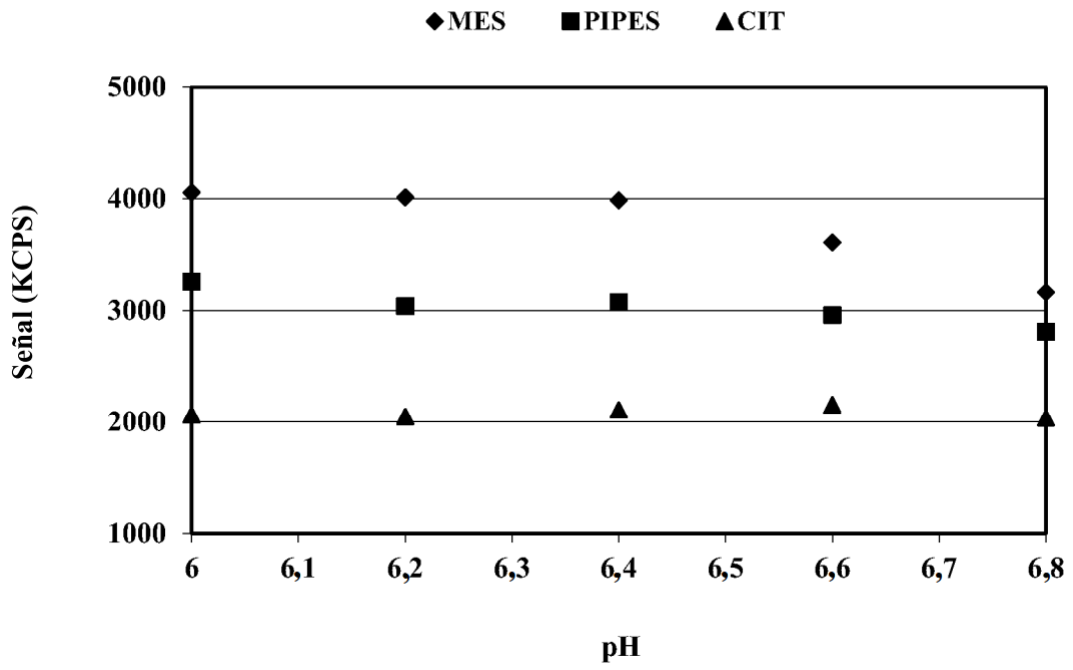


FIG.1

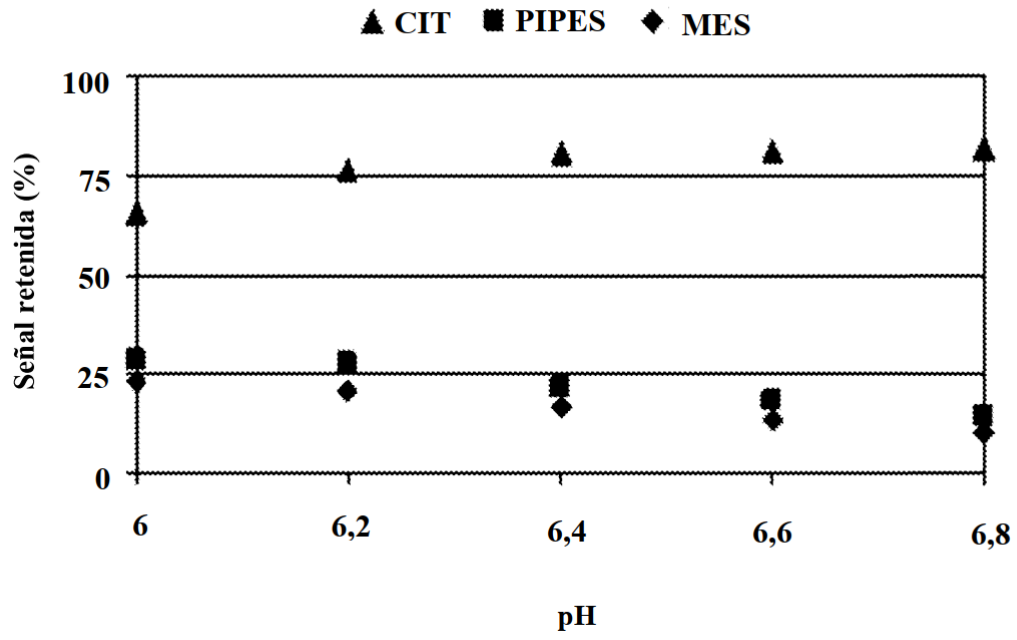


FIG. 2