

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 337**

51 Int. Cl.:

**C08F 220/58** (2006.01)

**C09D 133/24** (2006.01)

**G01N 33/78** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2015 PCT/US2015/013479**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15116795**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2015 E 15743428 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3099739**

54 Título: **Soportes paramagnéticos para uso como reactivos de ensayo**

30 Prioridad:

**31.01.2014 US 201461934111 P**

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

**25.03.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LELE, BHALCHANDRA S.;  
ALLGAIER, ERIC;  
PERVERE, ROBERT;  
LYONS, JEREMY y  
ST-ONGE, STEVE**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 750 337 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

Soportes paramagnéticos para uso como reactivos de ensayo

Antecedentes

5 La presente invención se refiere en general a soportes sólidos recubiertos con un copolímero aleatorio y, más particularmente, a composiciones útiles como reactivos de ensayo.

10 Las partículas paramagnéticas recubiertas de aldehído son útiles como reactivos en ensayos. Sin embargo, las partículas paramagnéticas recubiertas de aldehído, por ejemplo, las partículas paramagnéticas recubiertas con glutaraldehído, exhiben una inestabilidad indeseable durante el almacenamiento. Las partículas magnéticas de látex de poliestireno pueden emplearse en ensayos, pero tales partículas son más costosas que las partículas paramagnéticas. La solicitud de patente estadounidense US 2013345357 A1 está dirigida a una composición para usar como reactivo de ensayo que comprende un soporte sólido que comprende un miembro de un sistema productor de señal y un recubrimiento de un copolímero sintético. El copolímero sintético comprende un primer monómero polimerizado que comprende una unidad estructural sobresaliente que comprende una funcionalidad reactiva o un derivado de una funcionalidad reactiva y un segundo monómero polimerizado que comprende una unidad estructural sobresaliente que comprende al menos 1 átomos de carbono y al menos 2 heteroátomos.

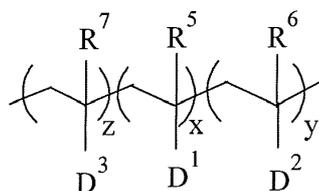
15 Existe la necesidad de utilizar un recubrimiento sobre la superficie de partículas paramagnéticas para unir diversas unidades estructurales a las partículas donde las partículas resultantes tienen una estabilidad mejorada durante el almacenamiento.

Resumen

20 Un ejemplo de acuerdo con los principios aquí descritos es una composición para usar como reactivo de ensayo. La composición comprende un soporte sólido paramagnético y un recubrimiento de un copolímero sintético de acuerdo con la reivindicación 1.

25 Otro ejemplo de acuerdo con los principios descritos en este documento es un método para determinar en una muestra uno o ambos de la presencia y la cantidad de un analito. Se proporciona una combinación en un medio. La combinación comprende la muestra, un miembro de un sistema productor de señal que está unido a un miembro de un par de unión específico que se une al analito o que está unido a un análogo de analito, y una composición que comprende una partícula paramagnética que comprende un miembro de un par de unión específico, que se une al analito, o a un miembro de un par de unión específico que se une al analito, para formar un complejo relacionado con la presencia del analito, y un recubrimiento de un copolímero sintético. El copolímero sintético comprende dos o tres de un primer monómero copolimerizado, un segundo monómero copolimerizado y un tercer monómero copolimerizado como se describió anteriormente. La combinación se somete a condiciones para formar el complejo y la partícula paramagnética se separa del medio mediante, por ejemplo, una separación magnética. El miembro del sistema productor de señal se activa y se detecta la cantidad del complejo. La cantidad del complejo está relacionada con uno o ambos de la presencia y la cantidad de analito en la muestra.

35 Otro ejemplo de acuerdo con los principios aquí descritos es un copolímero de fórmula:



en donde

D<sup>1</sup> es -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-Z, -C(O)-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-CH(OH)-R<sup>1</sup>, o un derivado del mismo, -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-N<sup>⊕</sup>(R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)-(CH<sub>2</sub>)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, o -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-O-PO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-N<sup>⊕</sup>(R<sup>11</sup>R<sup>12</sup>R<sup>13</sup>) en donde:

40 X es O o NR<sup>2</sup> en donde R<sup>2</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

Z es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

R<sup>1</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

m es de 1 a 100,

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

45 R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

p es de 1 a 10,

q es de 1 a 10,

r es de 1 a 10,

s es de 1 a 10,

5 t es de 1 a 10, y

D<sup>2</sup> es

(a) -C(O)-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-G en donde A es O o NR en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y n es de 1 a 10 y en donde G es CHO; CH(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> en donde R<sup>8</sup> es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; COOH o un derivado del mismo; OH; o un miembro de un par de unión específico; o

10 (b) -OC (O) NR-J en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y J es un miembro de un par de unión específico; y;

D<sup>3</sup> es -COOH o un derivado del mismo;

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

x es de 1 a aproximadamente 1000;

15 y es de 1 a aproximadamente 1000; y

z es de 1 a aproximadamente 1000,

en donde la distribución de los monómeros copolimerizados puede ser tal que en cualquier punto de la cadena polimérica un primer monómero copolimerizado, un segundo monómero copolimerizado y un tercer monómero copolimerizado se alternan o repiten a diferencia de los copolímeros de bloque.

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de una síntesis de MAMDMA.

La Figura 2 es un diagrama esquemático de una síntesis de partículas paramagnéticas (PMP) recubiertas con poli(ácido acrílico-co-MA-ActI) -Estreptavidina como referencia.

La Figura 3 es un diagrama esquemático de una síntesis de un copolímero con tres monómeros copolimerizados.

25 La Figura 4 es un diagrama esquemático de una síntesis de PMP recubiertas con poli(HEMA-co-AA-co-MA-ActI)-estreptavidina (SA).

La Figura 5 es un diagrama esquemático de una síntesis de poli(MPEG1100-MA-co-MA-ActI) y poli(MPEG300-MA-co-MA-ActI) como referencia.

La Figura 6 es un diagrama esquemático de una síntesis de poli(sulfobetaina-MA-co-MA-ActI) como referencia.

30 La Figura 7 es un diagrama esquemático de una síntesis de poli(AA-co-MA-ActI) como referencia.

La Figura 8 es un diagrama esquemático de una síntesis de PMP recubiertas con copolímero-conjugados anti-FITC como referencia.

La Figura 9 es un diagrama esquemático de una síntesis de PMP recubiertas con copolímero con BgG y TG unidos a ella como referencia.

35 La Figura 10 es una representación gráfica de los resultados obtenidos en el ensayo de Folato utilizando PMP recubiertas con poli(HEMA-co-AA-co-MA-ActI)-Biotina-Estreptavidina y realizado en un aparato CENTAUR® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE). Los resultados obtenidos se interpretaron gráficamente como porcentaje (%) de recuperación frente al tiempo.

Descripción detallada de realizaciones específicas

40 Composiciones

El copolímero sintético es un copolímero aleatorio que consta de tres monómeros copolimerizados. El copolímero sintético se emplea como recubrimiento en la superficie de soportes sólidos paramagnéticos. Una de las unidades de monómero del copolímero comprende funcionalidades reactivas para la conjugación con moléculas de interés tales como, por ejemplo, un soporte sólido paramagnético o un miembro de un par de unión específico ("miembro sbp").

Soportes sólidos paramagnéticos recubiertos con copolímeros sintéticos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, exhiben una estabilidad mejorada para su uso en ensayos en comparación con otros revestimientos. Los revestimientos de copolímero sintético proporcionan una alternativa menos costosa para soportes sólidos paramagnéticos sobre otros soportes sólidos tales como, por ejemplo, partículas magnéticas de látex.

- 5 En el copolímero aleatorio, la distribución de los monómeros copolimerizados puede ser tal que en cualquier punto de la cadena polimérica un primer monómero copolimerizado, un segundo monómero copolimerizado y un tercer monómero copolimerizado se alternan o repiten a diferencia de los copolímeros de bloque.

Los monómeros a partir de los cuales se forma el copolímero incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, monómeros de vinilo, monómeros alílicos, olefinas y cualquier molécula pequeña que contenga al menos un grado de insaturación, y mezclas o dos o más de los monómeros anteriores en donde la funcionalidad polimerizable es un doble enlace carbono-carbono o un triple enlace carbono-carbono. Las clases de monómeros de vinilo incluyen, pero no se limitan a, ácido metacrílico, metacrilatos, metacrilamida, metacrilamidas N- y N,N-disustituidas, monómeros vinilaromáticos, haluros de vinilo, ésteres de vinilo de ácidos carboxílicos (por ejemplo, acetato de vinilo), óxido de etileno, acrilatos, diacrilatos y dimetacrilatos.

- 15 Los ejemplos de metacrilatos incluyen metacrilatos apropiadamente sustituidos con una unidad estructural sobresaliente de acuerdo con las realizaciones presentes en donde los metacrilatos incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, metacrilato de propilo, metacrilato de isopropilo, metacrilato de n-butilo, metacrilato de isobutilo, y metacrilato de tert-butilo, por ejemplo. Ejemplos de monómeros vinilaromáticos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, estireno, estireno-butadieno, p-clorometilostireno y divinilbenceno
- 20 apropiadamente sustituidos, por ejemplo. Los haluros de vinilo que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, cloruro de vinilo y fluoruro de vinilideno apropiadamente sustituidos. Los ésteres vinílicos de ácidos carboxílicos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, acetato de vinilo, butirato de vinilo, 3,4-dimetoxibenzoato de vinilo, malato de vinilo y benzoato de vinilo apropiadamente sustituidos.

- 25 En algunas realizaciones, el número de cada monómero copolimerizado diferente en el copolímero se controla durante la preparación del polímero funcionalizado controlando la concentración molar de las unidades de monómero que se emplean en la preparación del copolímero sintético. Por lo tanto, el número de cada uno de los monómeros copolimerizados (x, y y z en las fórmulas de este documento) se controla en el copolímero funcionalizado final. El copolímero puede adaptarse, por ejemplo, a uno o más de un soporte sólido paramagnético particular, a composiciones que comprenden dichos soportes y al uso de dicha composición.

- 30 El término "monómero" o "unidad de monómero" significa una molécula capaz de someterse a polimerización para formar un polímero; La molécula comprende una funcionalidad polimerizable. El número de unidades de monómero depende de uno o más del número de átomos en la cadena de la unidad de monómero y la composición de la unidad de monómero, por ejemplo.

- 35 Como se mencionó anteriormente, las composiciones para uso en la preparación de reactivos de ensayo o para uso como reactivos de ensayo comprenden un soporte sólido y un recubrimiento de un copolímero sintético. El copolímero sintético consta de tres monómeros que se copolimerizan para formar el polímero. El copolímero sintético comprende una cadena principal de polímero con unidades estructurales sobresalientes, cuya naturaleza está directamente relacionada con la naturaleza de los monómeros copolimerizados. En algunas realizaciones, el copolímero comprende una cadena principal polietilénica, que comprende una cadena lineal de grupos etilénicos, es decir, grupos -(CHR-CHR)- (donde R es alquilo o hidrógeno) formados a partir de monómeros que comprenden dobles enlaces. También se incluyen otros tipos de cadenas principales de polímeros y dependen de la naturaleza de los monómeros. En algunos ejemplos, la cadena principal polietilénica tiene la fórmula  $-\text{CH}_2-\text{CHR}^9-$  en donde  $\text{R}^9$  es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, o de 1 a 5 átomos de carbono, o de 1 a 4 átomos de carbono, o de 1 a 3 átomos de carbono, o 1 a 2 átomos de carbono, o 2 a 5 átomos de carbono, o 2 a 4 átomos de carbono, o 2 a 3 átomos de carbono, 3 a 5 átomos de carbono, o 3 a 4 átomos de carbono, o 4 a 5 átomos de carbono, o 1 átomo de carbono.
- 45

El primer monómero copolimerizado comprende una unidad estructural sobresaliente de la fórmula:  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{Z}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{X}-(\text{CH}_2)_p-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^1$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_q-\text{N}^\oplus(\text{R}^3\text{R}^4)-(\text{CH}_2)_r-\text{SO}_3^-$  o  $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_s-\text{O}-\text{PO}_2-(\text{CH}_2)_t-\text{N}^\oplus(\text{R}^{11}\text{R}^{12}\text{R}^{13})$  en donde:

- 50  $\text{R}^1$  es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, o de 1 a 5 átomos de carbono, o de 1 a 4 átomos de carbono, o de 1 a 3 átomos de carbono, o de 1 a 2 átomos de carbono, o de 2 a 5 átomos de carbono, o 2 a 4 átomos de carbono, o de 2 a 3 átomos de carbono, de 3 a 5 átomos de carbono, o de 3 a 4 átomos de carbono, o de 4 a 5 átomos de carbono, o 1 átomo de carbono;

- 55 X es O o  $\text{NR}^2$  en donde  $\text{R}^2$  es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, o 1 a 5 átomos de carbono, o 1 a 4 átomos de carbono, o 1 a 3 átomos de carbono, o 1 a 2 átomos de carbono, o 2 a 5 átomos de carbono, o 2 a 4 átomos de carbono, o 2 a 3 átomos de carbono, 3 a 5 átomos de carbono, o 3 a 4 átomos de carbono, o 4 a 5 átomos de carbono, o 1 átomo de carbono;

Z es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, o de 1 a 5 átomos de carbono, o de 1 a 4 átomos de carbono, o de 1 a 3 átomos de carbono, o de 1 a 2 átomos de carbono, o de 2 a 5 átomos de carbono, o 2 a 4 átomos de carbono, o de

## ES 2 750 337 T3

2 a 3 átomos de carbono, de 3 a 5 átomos de carbono, o de 3 a 4 átomos de carbono, o de 4 a 5 átomos de carbono, o 1 átomo de carbono;

m es 1 a 100, o 2 a 100, o 3 a 100, o 4 a 100, o 1 a 90, o 1 a 80, o 1 a 70, o 1 a 60, o 1 a 50, 1 a 40, o 1 a 30, o 1 a 20, o 1 a 10, o 1 a 5, o 5 a 100, o 5 a 90, o 5 a 80, o 5 a 70, o 5 a 60, o 5 a 50, 5 a 40, o 5 a 30, o 5 a 20, o 5 a 10, o 10 a 100, o 10 a 90, o 10 a 80, o 10 a 70, o 10 a 60, o 10 a 50, o 10 a 40, o 10 a 30, o 20 a 30, o 10 a 20, por ejemplo;

5

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 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, o 5 a 6 átomos de carbono, o 1 átomo de carbono, por ejemplo;

R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 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, o 5 a 6 átomos de carbono, o 1 átomo de carbono, por ejemplo;

10 p es 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, u 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo;

15 q es 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, u 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo;

20 r es 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, u 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo;

25 s es 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, u 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo;

t es 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, o 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo.

30 El segundo monómero copolimerizado comprende una unidad estructural sobresaliente de la fórmula:

(a) -C(O)-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-G, en donde:

A es O o NR en donde R es H o alquilo de 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 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, o 5 a 6 átomos de carbono, o 1 átomo de carbono, por ejemplo;

35 n es 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, u 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo; y

G es CHO; CH(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> en donde R<sup>8</sup> es alquilo de 1 a 6, o de 1 a 5, o de 1 a 4, o de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 6, o de 2 a 5, o de 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, o 5 a 6 átomos de carbono, o 1 átomo de carbono, por ejemplo; COOH o un derivado del mismo; OH; o un miembro de sbp; o

40 (b) -OC(O)NR-J en donde R es como se definió anteriormente y J es un miembro sbp.

El tercer monómero copolimerizado comprende una unidad estructural sobresaliente de la fórmula: -COOH o un derivado del mismo. El derivado puede ser, a modo de ilustración y no de limitación, un éster, una amida, un carbamato o una hidrazida, por ejemplo. En algunos ejemplos, el tercer monómero copolimerizado comprende una unidad estructural sobresaliente de la fórmula: -COOR<sup>10</sup> en donde R<sup>10</sup> es H o alquilo de 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 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, o 5 a 6 carbonos átomos, por ejemplo

45

Como se mencionó anteriormente, cuando el primer monómero copolimerizado es -C(O)-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-CH(OH)-R<sup>1</sup> en donde R<sup>1</sup> es distinto de H, el copolímero sintético comprende los tres monómeros copolimerizados, el segundo monómero copolimerizado y el tercer monómero copolimerizado.

50 Ejemplos de copolímeros sintéticos de acuerdo con los principios descritos en este documento pueden sintetizarse de acuerdo con la química de polímeros estándar para la síntesis de copolímeros aleatorios usando unidades monoméricas apropiadas como se identifica anteriormente. En algunas realizaciones, las unidades de monómero que comprenden una o más funcionalidades polimerizables se pueden combinar en una sola etapa de polimerización. En esta última metodología de polimerización, el número de cada uno de los monómeros copolimerizados del copolímero puede controlarse controlando la concentración molar de las unidades de monómero. Por ejemplo, el número de

55

monómeros copolimerizados puede controlarse mediante la relación de alimentación de los monómeros durante la polimerización. En consecuencia, durante una polimerización, la relación de alimentación de uno de los monómeros puede aumentarse sobre la de los otros monómeros. La relación de los monómeros copolimerizables (primer, segundo y tercer monómeros copolimerizables) durante una polimerización puede ser 1:1:0, 1:1:1, o 1.5:1:0, o 1.5:1:1, o 2:1:0, o 22:1:1, o 2.5:1:0, o 2.5:1:1, o 3:1:0, o 3:1:1, o 3.5:1:0, o 3.5:1:1, o 4:1:0, o 4:1:1, o 4.5:1:0, o 4.5:1:1, o 5:1:0, o 5:1:1, o 5.5:1:0, o 5.5:1:1, o 6:1:0, o 6:1:1, 10: 1:0, 0:10:1, 100:1:0, 0:1:100, por ejemplo. Esta relación de alimentación controla el valor de x, y y z en las fórmulas de este documento.

Los copolímeros aleatorios pueden prepararse mediante cualquier técnica de polimerización para la preparación de copolímeros aleatorios. Las técnicas de polimerización incluyen, por ejemplo, polimerización por radicales, polimerización por radicales con transferencia de átomos, fragmentación por adición reversible y polimerización por transferencia de cadena, polimerización mediada por nitróxido, y así sucesivamente. Las condiciones para la polimerización, tales como, por ejemplo, temperatura, medio de reacción, pH, duración y el orden de adición de los reactivos dependen de uno o más del tipo de polimerización empleado, la naturaleza de los reactivos monoméricos que incluyen cualquier funcionalidad polimerizable empleada y la naturaleza de cualquier catalizador empleado, por ejemplo. Tales condiciones son conocidas en general ya que los tipos de técnicas de polimerización que se pueden usar son bien conocidos en la técnica.

El número de átomos de carbono en la cadena del esqueleto principal del copolímero depende del número y la naturaleza de cada una de las unidades de monómero copolimerizadas, tales como, por ejemplo, el número de átomos de carbono en la funcionalidad polimerizable de las unidades de monómero y el peso molecular promedio del copolímero, por ejemplo. El número de cada uno del primer monómero copolimerizado, el segundo monómero copolimerizado y el tercer monómero copolimerizado (si está presente), respectivamente, en el copolímero es de 1 a aproximadamente 1,000, o de 1 a aproximadamente 750, o de 1 a aproximadamente 500, o de 1 a aproximadamente 250, o 1 a aproximadamente 100, o 1 a aproximadamente 50, o 2 a aproximadamente 1,000, o 2 a aproximadamente 750, o 2 a aproximadamente 500, o 2 a aproximadamente 250, o 2 a aproximadamente 100, o 2 a aproximadamente 50, o 5 a aproximadamente 1,000, o 5 a aproximadamente 750, o 5 a aproximadamente 500, o 5 a aproximadamente 250, o 5 a aproximadamente 100, o 5 a aproximadamente 50, o 10 a aproximadamente 1,000, o 10 a aproximadamente 750, o 10 a aproximadamente 500, o 10 a aproximadamente 250, o 10 a aproximadamente 100, o 10 a aproximadamente 50, o 100 a aproximadamente 1,000, o 100 a aproximadamente 750, o 100 a aproximadamente 500, o 100 a aproximadamente 250, por ejemplo.

El término "funcionalidad polimerizable" se refiere a una porción de una unidad de monómero que reacciona con una porción de otra molécula del monómero o una porción de una molécula de un monómero diferente tal como, por ejemplo, una unidad estructural que comprende uno o más dobles o triples enlaces tales como, por ejemplo, grupos alilo, grupos vinilo, grupos acrilato, grupos metacrilato, grupos acrilamida y grupos metacrilamida

En algunas realizaciones, el peso molecular promedio en peso (daltons) (Da) del copolímero es de aproximadamente 300 a aproximadamente 10,000,000 o más, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 10,000,000, o de aproximadamente 1,000 a aproximadamente 10,000,000, o de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 10,000,000, o de aproximadamente 100,000 a aproximadamente 10,000,000, o 300 a aproximadamente 5,000,000 o más, o aproximadamente 500 a aproximadamente 5,000,000, o aproximadamente 1,000 a aproximadamente 5,000,000, o aproximadamente 10,000 a aproximadamente 5,000,000, o aproximadamente 100,000 a aproximadamente 5,000,000, o 300 a aproximadamente 1,000,000 o más, o aproximadamente 500 a aproximadamente 1,000,000, o aproximadamente 1,000 a aproximadamente 1,000,000, o aproximadamente 10,000 a aproximadamente 1,000,000, o aproximadamente 100,000 a aproximadamente 1,000,000, o aproximadamente 1,000,000 a aproximadamente 100,000 a aproximadamente 750,000, o aproximadamente 500 a aproximadamente 750,000, o aproximadamente 1,000 a aproximadamente 750,000, o aproximadamente 10,000 a aproximadamente 750,000, o aproximadamente 100,000 a aproximadamente 750,000, o aproximadamente 100 a aproximadamente 500,000, o aproximadamente 200 a aproximadamente 500,000, o aproximadamente 1,000 a aproximadamente 500,000, o aproximadamente 10,000 a aproximadamente 500,000, o aproximadamente 100,000 a aproximadamente 500,000, por ejemplo.

En algunos ejemplos, un copolímero sintético de acuerdo con los principios descritos en este documento puede emplearse como un recubrimiento sobre un soporte sólido paramagnético. El término "paramagnético" se refiere a sustancias en las que se pueden introducir propiedades magnéticas leves que resultan en una atracción débil a cualquier polo de un imán, un estado que se pierde al retirarlo del campo magnético. Las sustancias paramagnéticas típicamente tienen electrones "d" no apareados. Las sustancias paramagnéticas incluyen, entre otras, sales metálicas tales como, por ejemplo, óxidos metálicos y haluros metálicos, por ejemplo; y elementos metálicos, por ejemplo. El metal puede ser, a título ilustrativo y no limitativo, hierro, cromo, litio, sodio, magnesio, aluminio, manganeso, estroncio, zirconio, molibdeno, rutenio, rodio, paladio, estaño, samario, europio, tungsteno, y platino, por ejemplo.

El soporte sólido paramagnético puede tener cualquiera de una serie de formas tales como, por ejemplo, partículas, incluidas perlas y partículas, película, membrana, tubo, pozo, tira, varilla y superficies planas como, por ejemplo, placas. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte sólido puede o no ser suspendible en el medio en donde se emplea.

En algunas realizaciones, el soporte sólido paramagnético es una partícula paramagnética. Las partículas generalmente tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 100 micras, o de

aproximadamente 0.05 a aproximadamente 100 micras, o de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 micras, o de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 100 micras, o de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 50 micras, o de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 50 micras, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 50 micras, o aproximadamente 0.5 a aproximadamente 50 micras, o aproximadamente 0.02 a aproximadamente 20 micras, o aproximadamente 0.05 a aproximadamente 20 micras, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 20 micras, o aproximadamente 0.5 a aproximadamente 20 micras, 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, a modo de ilustración y sin limitación, las partículas paramagnéticas son partículas de óxido de hierro (II), partículas de óxido de hierro (III), mezclas de partículas de óxido de hierro (II) y óxido de hierro (III), partículas de óxido de cromo y partículas formadas por óxidos de litio, sodio, magnesio, aluminio, manganeso, estroncio, zirconio, molibdeno, rutenio, rodio, paladio, estaño, samario, europio, tungsteno o platino, y mezclas de dos o más de los anteriores, por ejemplo.

Como se mencionó anteriormente, un copolímero sintético de acuerdo con los principios descritos en este documento puede emplearse como un recubrimiento sobre un soporte sólido paramagnético. El recubrimiento del soporte con el copolímero se puede lograr de varias maneras. El copolímero puede estar unido a la superficie del soporte covalentemente. En algunas realizaciones, la unión covalente puede llevarse a cabo por reacción de algunas de las funcionalidades reactivas tales como, por ejemplo, grupos aldehído, del copolímero con una funcionalidad en la superficie del soporte. Como se mencionó anteriormente, en algunas realizaciones, dependiendo de la naturaleza del soporte, pueden estar presentes funcionalidades reactivas adecuadas en la superficie del soporte o pueden introducirse sintéticamente en la superficie. Las funcionalidades reactivas restantes tales como, por ejemplo, grupos aldehído, están disponibles para reacción con un miembro sbp adecuadamente funcionalizado, por ejemplo.

El término "funcionalidad reactiva" es 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. En algunas realizaciones, la funcionalidad reactiva es un aldehído y el primer monómero copolimerizado comprende una unidad estructural aldehído.

El término "derivado de una funcionalidad reactiva" significa una unidad estructural que se forma por la reacción de una funcionalidad reactiva con otra unidad estructural que comprende una funcionalidad reactiva con la funcionalidad reactiva formando así un enlace covalente que une dos moléculas para formar el derivado. El derivado de una funcionalidad reactiva puede comprender un acetal, un éster carboxílico, una amida, un éter o un tioéter, por ejemplo. En algunas realizaciones, el derivado de una funcionalidad reactiva puede ser un producto de reacción de una funcionalidad reactiva con una funcionalidad reactiva de un miembro sbp por lo que el miembro sbp se une covalentemente al copolímero. Las funcionalidades en el miembro sbp pueden estar presentes naturalmente en el miembro sbp o pueden introducirse sintéticamente en el miembro sbp. Dichas funcionalidades incluyen, por ejemplo, grupos amina, grupos hidroxilo, grupos sulfhidrilo y grupos carboxilo. En algunas realizaciones, el derivado de una funcionalidad reactiva puede ser un producto de reacción de una funcionalidad reactiva con una funcionalidad reactiva de una partícula mediante la cual el copolímero se une covalentemente a la partícula proporcionando de ese modo un recubrimiento del copolímero en la superficie de la partícula. Las funcionalidades en la partícula pueden estar presentes naturalmente en la partícula o pueden introducirse sintéticamente en la superficie de la partícula. Dichas funcionalidades incluyen grupos amina, grupos hidroxilo, grupos azida y grupos carboxilo, por ejemplo. En algunas realizaciones, el derivado de una funcionalidad reactiva es un derivado de aldehído.

El término "derivado de aldehído" significa una unidad estructural que se forma por la reacción de un grupo aldehído con otra unidad estructural que comprende una funcionalidad reactiva con un grupo aldehído. El derivado de aldehído puede ser un acetal que resulta de la reacción de dos funcionalidades de alcohol con un oxígeno carbonílico de un aldehído. El derivado de aldehído puede ser un producto de reacción de un grupo aldehído con un miembro sbp por medio de la reacción del aldehído con una funcionalidad del miembro sbp. Las funcionalidades en el miembro sbp pueden estar presentes naturalmente en el miembro sbp o pueden introducirse sintéticamente en el miembro sbp. Dichas funcionalidades incluyen, por ejemplo, grupos amina. La reacción entre un grupo aldehído y un miembro sbp puede ser, por ejemplo, mediante la formación de bases de Schiff entre una alquilamina o una arilamina del miembro sbp y el grupo aldehído. La reacción puede ser por medio de aminación reductora que implica el grupo aldehído y un grupo amina del miembro sbp. En otras realizaciones, los derivados de aldehído incluyen, por ejemplo, acetales y compuestos de adición de bisulfito. En algunas realizaciones, la funcionalidad aldehído puede reaccionar con un grupo amina correspondiente en la superficie de una partícula, por lo que la partícula se une covalentemente al copolímero proporcionando de ese modo un recubrimiento del copolímero en la superficie de la partícula. Las funcionalidades en la partícula pueden estar presentes naturalmente en la partícula o pueden introducirse sintéticamente en la superficie de la partícula.

En algunas realizaciones, la cantidad del copolímero sintético recubierto en el soporte sólido paramagnético depende de una o más de la naturaleza del soporte, la naturaleza del copolímero, la naturaleza de un miembro de sbp, ya sea que la unión del copolímero al soporte es en virtud del sitio de soporte de aldehído, y si un miembro sbp está unido al sitio de soporte de aldehído, por ejemplo. En algunas realizaciones, la cantidad (porcentaje en peso) de copolímero recubierto sobre el soporte es de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10%, o de aproximadamente 0.1 a

aproximadamente 9%, o de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 8%, o de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 7%, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 6%, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5%, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 4%, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3%, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2%, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1%, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5%, o aproximadamente 1 a aproximadamente 10%, o aproximadamente 1 a aproximadamente 9%, o aproximadamente 1 a aproximadamente 8%, o aproximadamente 1 a aproximadamente 7%, o aproximadamente 1 a aproximadamente 6%, o aproximadamente 1 a aproximadamente 5%, o aproximadamente 1 a aproximadamente 4%, o aproximadamente 1 a aproximadamente 3%, o aproximadamente 1 a aproximadamente 2%, o aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.5%, o aproximadamente 0.06 a aproximadamente 0.5%, o aproximadamente 0.07 a aproximadamente 0.5%, o aproximadamente 0.08 a aproximadamente 0.5%, o aproximadamente 0.09 a aproximadamente 0.5%, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5%, o aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.4%, o aproximadamente 0.06 a aproximadamente 0.4%, o aproximadamente 0.07 a aproximadamente 0.4%, o aproximadamente 0.08 a aproximadamente 0.4%, o aproximadamente 0.09 a aproximadamente 0.4%, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.4%, o aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.3%, o aproximadamente 0.06 a aproximadamente 0.3%, o un aproximadamente 0.07 a aproximadamente 0.3%, o aproximadamente 0.08 a aproximadamente 0.3%, o aproximadamente 0.09 a aproximadamente 0.3%, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.3%, o aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.2%, o aproximadamente 0.06 a aproximadamente 0.2%, o aproximadamente 0.07 a aproximadamente 0.2%, o aproximadamente 0.08 a aproximadamente 0.2%, o aproximadamente 0.09 a aproximadamente 0.2%, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.2%, por ejemplo.

La selección de un recubrimiento de copolímero para un soporte sólido paramagnético depende de uno o más de varios factores, como, por ejemplo, el tipo de ensayo en donde se utiliza el soporte sólido paramagnético, el rango de concentración esperado de un analito, el físico características y origen de un miembro sbp tal como un anticuerpo usado en un ensayo, la variación en la densidad efectiva de recubrimiento del miembro sbp, el pH de la mezcla de reacción final y la fuerza iónica de la mezcla de reacción final. Dependiendo de tales factores, se puede preferir un recubrimiento de copolímero sobre otro recubrimiento de copolímero en cualquier aplicación particular.

Como se indicó anteriormente, una composición para usar como reactivo de ensayo de acuerdo con los principios descritos en el presente documento puede comprender un miembro sbp, que es una de dos moléculas diferentes, que tiene un área en la superficie o en una cavidad, que se une específicamente a definido de ese modo como complementario con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros sbp generalmente serán miembros de un par inmunológico como antígeno-anticuerpo o hapteno-anticuerpo, aunque otros pares de unión específicos como biotina-avidina, receptores de hormonas-hormonas, sustrato enzimático, dúplex de ácido nucleico, proteína A de IgG, polinucleótidos pares tales como ADN-ADN, ADN-ARN, por ejemplo, no son pares inmunológicos, sino que están incluidos dentro del alcance de la expresión miembro sbp. En algunas realizaciones, dependiendo de la naturaleza del ensayo a realizar como se explica más detalladamente a continuación, se incluyen otros reactivos en el medio tales como, por ejemplo, otros miembros sbp y miembros de un sistema productor de señal ("miembro(s) sps").

El término "hapteno" se refiere a un compuesto capaz de unirse específicamente a los anticuerpos correspondientes, pero no actúa en sí mismo como un inmunógeno (o antígeno) para la preparación de los anticuerpos. Los haptenos tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5,000, o inferior a aproximadamente 4,000, o inferior a aproximadamente 3,000, o inferior a aproximadamente 2,000, o inferior a aproximadamente 1,500, por ejemplo. El término "antígeno" se refiere a compuestos que son inmunogénicos y conducen a la formación de anticuerpos tras la administración a un huésped. Los antígenos tienen un peso molecular de más de aproximadamente 5,000, o más de aproximadamente 10,000, por ejemplo.

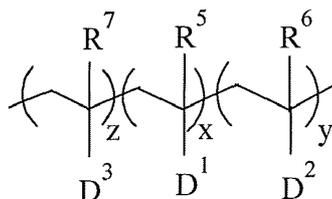
El miembro sbp está asociado con el soporte sólido paramagnético de una composición de acuerdo con los principios aquí descritos. Como se usa en el presente documento, la expresión "asociado con" incluye la unión covalente de una unidad estructural a otra unidad estructural ya sea por un enlace directo o a través de un grupo espaciador, la unión no covalente de una unidad estructural a otra unidad estructural ya sea directamente o por medio de miembros de unión específicos unido a los unidades estructurales, y recubriendo una unidad estructural sobre otra unidad estructural, por ejemplo. En algunos ejemplos, el miembro sbp está directamente asociado o unido al soporte sólido paramagnético por medio de la unión covalente al copolímero recubierto sobre el soporte sólido paramagnético. En algunos ejemplos, el copolímero está unido covalentemente a un sitio que contiene aldehído del copolímero que recubre el soporte sólido paramagnético.

En algunos ejemplos, el miembro sbp está asociado o unido al soporte sólido paramagnético indirectamente mediante la unión de una molécula pequeña a un asociado de unión para la molécula pequeña. La molécula pequeña es una molécula orgánica que tiene un peso molecular en el rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 2,000, o aproximadamente 100 a aproximadamente 1,500, o aproximadamente 100 a aproximadamente 1,000, o aproximadamente 100 a aproximadamente 500, o aproximadamente 100 a aproximadamente 400, o aproximadamente 100 a aproximadamente 300, o aproximadamente 100 a aproximadamente 200, o aproximadamente 200 a aproximadamente 2,000, o aproximadamente 200 a aproximadamente 1,500, o aproximadamente 200 a aproximadamente 1,000, o aproximadamente 200 a aproximadamente 500, o aproximadamente 200 a aproximadamente 400, o aproximadamente 200 a aproximadamente 300, por ejemplo.

5 Ejemplos de asociado de unión de molécula pequeña para los pares de molécula pequeña, a modo de ilustración y sin limitación, incluyen asociado de unión de biotina para biotina (por ejemplo, avidina, estreptavidina o anticuerpo para biotina), asociado de unión de destiobiotina para destiobiotina (por ejemplo, avidina, estreptavidina o anticuerpo para destiobiotina), asociado de unión a digoxina para digoxina (por ejemplo, anticuerpo para digoxina, etc.), asociado de unión a fluoresceína para fluoresceína (anticuerpo para fluoresceína, etc.), asociado de unión a rodamina para rodamina (por ejemplo, anticuerpo para rodamina) y asociado de unión a péptido para el péptido (anticuerpo para el péptido, etc.), por ejemplo. La expresión "asociado de unión" se refiere a una molécula que es un miembro sbp.

**Ejemplos de Copolímeros**

[0037] El copolímero aleatorio tiene la fórmula:



10

en donde:

D<sup>1</sup> es -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-Z, -C(O)-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-CH(OH)-R<sup>1</sup>, o un derivado del mismo, -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-N<sup>⊕</sup>(R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, o -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-O-PO<sub>2</sub><sup>-</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-N<sup>⊕</sup>(R<sup>11</sup>R<sup>12</sup>R<sup>13</sup>)

donde:

15

X es O o NR<sup>2</sup> en donde R<sup>2</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente,

Z es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente,

R<sup>1</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente,

m es de 1 a 100 y las variantes establecidas anteriormente,

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente,

20

R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y variantes como se establece anteriormente,

p es de 1 a 10 y las variantes establecidas anteriormente,

q es 1 a 10 y las variantes establecidas anteriormente,

r es de 1 a 10 y las variantes establecidas anteriormente,

25

s es de 1 a 10 y las variantes establecidas anteriormente,

t es de 1 a 10 y las variantes establecidas anteriormente, y

30

D<sup>2</sup> es (a) -C(O)-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-G en donde A es O o NR en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes establecidas anteriormente, y n es de 1 a 10 y en donde G es CHO; CH(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> en donde R<sup>8</sup> es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente; COOH o un derivado del mismo y las variantes establecidas anteriormente; OH; o un miembro de un par de unión específico; o (b) -OC(O)NR-J en donde R es como se definió anteriormente y J es un miembro de un par de unión específico; todos con y variantes como se establece anteriormente;

D<sup>3</sup> es -COOH o un derivado del mismo y las variantes expuestas anteriormente;

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente;

35

x es 1 a aproximadamente 1000, o 1 a aproximadamente 800, o 1 a aproximadamente 600, o 1 a aproximadamente 400, o 1 a aproximadamente 200, o 1 a aproximadamente 100, o aproximadamente 5 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 5 a aproximadamente 800, o aproximadamente 5 a aproximadamente 600, o aproximadamente 5 a aproximadamente 400, o aproximadamente 5 a aproximadamente 200, o aproximadamente 5 a aproximadamente 100, o aproximadamente 10 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 10 a aproximadamente 800, o aproximadamente 10 a aproximadamente 600, o aproximadamente 10 a aproximadamente 400, o aproximadamente 10 a aproximadamente 200, o aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 50 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 50 a aproximadamente 800, o aproximadamente 50 a aproximadamente 600, o aproximadamente 50 a aproximadamente 400, o aproximadamente 50 a aproximadamente 200, o

40

aproximadamente 50 a aproximadamente 100, o aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 100 a aproximadamente 800, o aproximadamente 100 a aproximadamente 600, o aproximadamente 100 a aproximadamente 400, o aproximadamente 100 a aproximadamente 200, por ejemplo ; y es 1 a aproximadamente 1000, o 1 a aproximadamente 800, o 1 a aproximadamente 600, o 1 a aproximadamente 400, o 1 a aproximadamente 200, o 1 a aproximadamente 100, o aproximadamente 5 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 5 a aproximadamente 800 , o aproximadamente 5 a aproximadamente 600, o aproximadamente 5 a aproximadamente 400, o aproximadamente 5 a aproximadamente 200, o aproximadamente 5 a aproximadamente 100, o aproximadamente 10 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 10 a aproximadamente 800, o aproximadamente 10 a aproximadamente 600, o aproximadamente 10 a aproximadamente 400, o aproximadamente 10 a aproximadamente 200, o aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 50 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 50 a aproximadamente 800, o aproximadamente 50 a aproximadamente 600, o aproximadamente 50 a aproximadamente 400, o aproximadamente 50 a aproximadamente 200, o aproximadamente 50 a aproximadamente 100, o aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 100 a aproximadamente 800, o aproximadamente 100 a aproximadamente 600, o aproximadamente 100 a aproximadamente 400, o aproximadamente 100 a aproximadamente 200, por ejemplo ; y z es de 1 a aproximadamente 1000.

Z puede ser 1 a aproximadamente 1000, o 1 a aproximadamente 800, o 1 a aproximadamente 600, o 1 a aproximadamente 400, o 1 a aproximadamente 200, o 1 a aproximadamente 100, o aproximadamente 5 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 5 a aproximadamente 800, o aproximadamente 5 a aproximadamente 600, o aproximadamente 5 a aproximadamente 400, o aproximadamente 5 a aproximadamente 200, o aproximadamente 5 a aproximadamente 100, o aproximadamente 10 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 10 a aproximadamente 800, o aproximadamente 10 a aproximadamente 600 , o aproximadamente 10 a aproximadamente 400, o aproximadamente 10 a aproximadamente 200, o aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 50 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 50 a aproximadamente 800, o aproximadamente 50 a aproximadamente 600, o aproximadamente 50 a aproximadamente 400, o aproximadamente 50 a aproximadamente 200, o aproximadamente 50 a aproximadamente 100, o aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 100 a aproximadamente 800, o aproximadamente 100 a aproximadamente 600, o aproximadamente 100 a aproximadamente 400, o aproximadamente 100 a aproximadamente 200, para ejemplo.

30 En algunos ejemplos, el copolímero tiene la fórmula anterior en donde:

A es NR en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente;

n es de 1 a 10 y las variantes establecidas anteriormente;

G es CHO; CH(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> en donde R<sup>8</sup> es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente; o un miembro de un par de unión específico;

35 D<sup>1</sup> es -C(O)-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-C(OH)-R<sup>1</sup> en donde R<sup>1</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes establecidas anteriormente, X es NR<sub>2</sub> en donde R<sup>2</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y variantes establecidas anteriormente y p es 1 a 10 y variantes establecidas anteriormente,

D<sup>3</sup> es -COOH o un derivado del mismo y las variantes expuestas anteriormente;

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente;

40 x es de 1 a aproximadamente 1000 y las variantes establecidas anteriormente;

y es de 1 a aproximadamente 1000 y las variantes establecidas anteriormente; y

z es de 1 a aproximadamente 1000 y las variantes establecidas anteriormente.

En algunos ejemplos, el copolímero tiene la fórmula anterior en donde:

A es NR en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente;

45 n es de 1 a 10 y las variantes establecidas anteriormente;

G es CHO; CH(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> en donde R<sup>8</sup> es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente; o un miembro de un par de unión específico;

D<sup>1</sup> es -C(O)-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-C(OH)-R<sup>1</sup>, en donde R<sup>1</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes indicadas anteriormente,

50 p es 1 a 10 y las variantes establecidas anteriormente,

D<sup>3</sup> es -COOH o un derivado del mismo y las variantes expuestas anteriormente;

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y las variantes expuestas anteriormente;  
 x es de 1 a aproximadamente 1000 y las variantes establecidas anteriormente;  
 y es de 1 a aproximadamente 1000 y las variantes establecidas anteriormente; y  
 z es de 1 a aproximadamente 1000 y las variantes establecidas anteriormente.

5 En algunos ejemplos, el copolímero tiene la fórmula anterior en donde:

A es NH;

n es 1;

G es CHO;

D<sup>1</sup> es -C(O)-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-CH<sub>2</sub>(OH), p es 2,

10 D<sup>3</sup> es -COOH;

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son metilo y R<sup>7</sup> es H;

x es de 1 a aproximadamente 1000 y las variantes establecidas anteriormente;

y es de 1 a aproximadamente 1000 y las variantes establecidas anteriormente; y

z es de 1 a aproximadamente 1000 y las variantes establecidas anteriormente.

15 Descripción general de ensayos en los que se pueden utilizar las composiciones presentes

La siguiente discusión es a modo de ilustración y no de limitación. Las presentes composiciones pueden emplearse en cualquier ensayo que implique la separación magnética de uno o más de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Como los ensayos implican uno o más pasos de separación, se los denomina ensayos heterogéneos. Los ensayos pueden ser competitivos o no competitivos.

20 Un ensayo es un método para determinar en una muestra uno o ambos de la presencia y la cantidad de un analito en la muestra. El analito es una sustancia de interés o el compuesto o composición por detectar y/o cuantificar. Los analitos incluyen, por ejemplo, medicamentos, metabolitos, pesticidas y contaminantes. Analitos representativos, a modo de ilustración y sin limitación, incluyen alcaloides, esteroides, lactamas, aminoalquilbencenos, benzheterocíclicos, purinas, medicamentos derivados de la marihuana, hormonas, polipéptidos que incluyen proteínas, inmunosupresores, vitaminas, prostaglandinas, antidepresivos tricíclicos, antineoplásicos, nucleósidos y nucleótidos que incluyen polinucleósidos y polinucleótidos, medicamentos individuales misceláneos que incluyen metadona, meprobamato, serotonina, meperidina, lidocaína, procainamida, acetilprocainamida, propranolol, griseofulvina, ácido valproico, butirofenonas, antihistamínicos, cloranfenicol, fármacos anticolinérgicos, y metabolitos y derivados de todos los anteriores. También se incluyen metabolitos relacionados con estados de enfermedad, aminoglucósidos, como gentamicina, kanamicina, tobramicina y amikacina, y pesticidas como, por ejemplo, bifenilos polihalogenados, ésteres de fosfato, tiofosfatos, carbamatos y sulfenamidas polihalogenados y sus metabolitos y derivados. El término "analito" también incluye combinaciones de dos o más de polipéptidos y proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. Dichas combinaciones incluyen, por ejemplo, componentes de bacterias, virus, cromosomas, genes, mitocondrias, núcleos y membranas celulares. Los analitos de proteína incluyen, por ejemplo, 25 inmunoglobulinas, citoquinas, enzimas, hormonas, antígenos cancerosos, marcadores nutricionales y antígenos específicos de tejido. Dichas proteínas incluyen, a modo ilustrativo y no limitativo, protaminas, histonas, albúminas, globulinas, escleroproteínas, fosfoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, glucoproteínas, 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, 30 hormonas proteicas como, por ejemplo, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, luteotropina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormonas tisulares, citoquinas, antígenos cancerosos como, por ejemplo, PSA, CEA, α-fetoproteína, fosfatasa ácida, CA19.9, CA15.3 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 mucopolisacáridos y polisacáridos. Como se indicó anteriormente, el término analito incluye además analitos de 45 oligonucleótidos y polinucleótidos tales como dúplex m-ARN, r-ARN, t-ARN, ADN y ADN-ARN, por ejemplo.

La muestra que se va a analizar puede ser no biológica o 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 y muestras minerales. La expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico, como, por ejemplo, fluido corporal y tejido corporal, que se obtiene del cuerpo de un mamífero, incluidos humanos, pájaros, reptiles y otros vertebrados. 50 Los fluidos corporales incluyen, por ejemplo, sangre entera, plasma, suero, líquido intersticial, sudor, saliva, orina, semen, líquido de ampollas, exudados inflamatorios, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, moco, líquido

linfático, moco vaginal, y similares. El tejido biológico incluye, pero no se limita a, tejido extirpado de un órgano u otra parte del cuerpo de un huésped, por ejemplo, biopsias de tejido; cabello y piel; por ejemplo.

5 En un método para determinar un analito en una muestra, se proporciona una combinación en un medio. La combinación comprende la muestra, un miembro sps que está unido a un miembro sbp que se une al analito o se une a un análogo de analito, y una composición que comprende un soporte sólido paramagnético que comprende un miembro sbp, que se une al analito o se une a un miembro sbp que se une al analito para formar un complejo relacionado con la presencia del analito, y un recubrimiento de un copolímero sintético como se describió anteriormente.

10 Un análogo de analito es un analito modificado o un radical orgánico que puede competir con un analito por un receptor, la modificación proporciona medios para unir un análogo de analito a otra molécula. El análogo del analito difiere del analito por al menos el reemplazo de un hidrógeno con un enlace que une el análogo del analito a otra unidad estructural. El análogo de analito puede unirse a un receptor de manera similar al analito. El análogo podría ser, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra el idiotipo de un anticuerpo para el analito o un analito que se ha modificado para incorporar un miembro sps.

15 La muestra se puede preparar en cualquier medio conveniente. Por ejemplo, la muestra puede prepararse en un medio de ensayo, que se trata más detalladamente a continuación. En algunos casos, se puede aplicar un pretratamiento a la muestra tal como, por ejemplo, lisar células sanguíneas o liberar un analito de sustancias de unión endógenas en la muestra. Tal tratamiento previo generalmente se realiza en un medio que no interfiere posteriormente con un ensayo. Se prefiere un medio acuoso para el pretratamiento donde el medio acuoso puede ser únicamente agua o únicamente un disolvente orgánico o mezclas de los mismos.

20 Un medio de ensayo, que en algunas realizaciones es un medio regulado acuoso a un pH moderado, es generalmente uno que proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir de 0.1 a aproximadamente 40 por ciento en volumen de un codisolvente tal como, por ejemplo, un disolvente orgánico miscible en agua, por ejemplo, un alcohol, un éter o una amida. El pH para el medio estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9.5, por ejemplo. El pH utilizado es a menudo 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 productor de señal, por ejemplo. Se pueden usar varios reguladores para lograr el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbitol, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINE y similares. El regulador particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro regulador.

30 Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en los métodos de ensayo. Por ejemplo, además de los reguladores, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. En algunas realizaciones, 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 sanguíneos. 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 estreptomina. Cualquiera de los materiales anteriores, si se emplea, está presente en una concentración o cantidad suficiente para lograr el efecto o la función deseados.

35 Como se mencionó anteriormente, para un ensayo para un analito, el soporte sólido paramagnético comprende un miembro sbp, que se une específicamente al analito o se une específicamente a un miembro sbp que se une específicamente al analito, para formar un complejo relacionado con la presencia del analito. La naturaleza del miembro sbp en el soporte sólido paramagnético depende de una o más de la naturaleza del analito, la naturaleza del ensayo empleado y las condiciones bajo las cuales se realiza un ensayo, por ejemplo. En un ejemplo, el miembro sbp en el soporte sólido paramagnético puede ser un anticuerpo que se une específicamente al analito. En otro ejemplo, el miembro sbp en el soporte sólido paramagnético puede ser un análogo de analito que se une a un anticuerpo para el analito. En otro ejemplo, el miembro sbp en el soporte sólido paramagnético puede ser un anticuerpo que se une específicamente a otro anticuerpo que se une específicamente al analito. En otro ejemplo, el miembro sbp en el soporte sólido paramagnético puede ser un miembro de un sbp que es específico para una unidad estructural que no sea un análogo de analito o un anticuerpo para el analito, como un asociado de unión para una molécula pequeña, donde el miembro sbp complementario es un asociado de unión para la molécula pequeña, como por ejemplo, estreptavidina (para biotina), avidina (para biotina) y proteína de unión a folato (para folato), por ejemplo.

55 Además de lo anterior, la combinación en el medio de ensayo también comprende un miembro sps que está unido a un miembro sbp que se une específicamente al analito o comprende además un miembro sps que está unido a un análogo de analito. La naturaleza de la molécula a la que se une el miembro sps depende de una o más de la naturaleza del analito, la naturaleza del ensayo empleado y la naturaleza del miembro sbp en el soporte sólido paramagnético, por ejemplo. En un ejemplo, el miembro sps está unido a un anticuerpo que se une específicamente al analito. En otro ejemplo, el miembro sps está unido a un análogo de analito.

En los métodos de ensayo de acuerdo con los principios descritos en este documento, la combinación anterior se somete a condiciones para formar el complejo. Dichas condiciones pueden incluir uno o más períodos de incubación que pueden aplicarse al medio en uno o más intervalos, incluidos los intervalos entre las adiciones de diversos reactivos empleados en un ensayo, incluidos los mencionados anteriormente, algunos de los cuales pueden estar en la combinación inicial. El medio se incuba habitualmente a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos y la unión entre miembros sbp complementarios tales como, por ejemplo, un analito y un miembro sbp complementario o primer y segundo miembros sbp. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y generalmente temperatura constante, preferiblemente temperatura ambiente, durante el período de medición. En algunas realizaciones, las temperaturas de incubación varían de aproximadamente 5° a aproximadamente 99°C, o de aproximadamente 15°C a aproximadamente 70°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 45°C, por ejemplo. El período de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0.2 segundos a aproximadamente 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, por ejemplo. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y de la velocidad de unión de los diversos reactivos, que está determinada por uno o más de la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de velocidad de disociación, por ejemplo.

Después de los períodos de incubación anteriores, si los hay, el miembro sps se activa y se detecta la cantidad del complejo. En algunos ejemplos, el soporte paramagnético al que se une el complejo se separa del medio de ensayo y opcionalmente se lava antes de la activación del miembro sps en el soporte sólido paramagnético. En algunos ejemplos, el medio de ensayo, del que se separa el soporte sólido paramagnético, se examina activando el complejo que no está unido al soporte sólido paramagnético. La cantidad del complejo está relacionada con uno o ambos de la presencia y la cantidad de analito en la muestra. La detección del complejo depende de uno o más de la naturaleza del ensayo que se realiza, la naturaleza de los miembros sps y la naturaleza de los miembros sbp, por ejemplo.

Como se mencionó anteriormente, la composición también comprende un miembro sps. La naturaleza del miembro sps depende del tipo de ensayo en donde se pueden emplear realizaciones de las presentes composiciones. El miembro sps puede ser una etiqueta, que es parte de un sistema de producción de señal. La naturaleza de la etiqueta depende del formato de ensayo particular como se discutió anteriormente. Un sistema productor de señal puede incluir uno o más componentes, siendo al menos un componente una etiqueta detectable, que genera una señal detectable que se relaciona con una o ambas cantidades de etiqueta unida y no unida, es decir, la cantidad de etiqueta unida o no unida al analito que está siendo detectado o a un agente que refleja la cantidad de analito que va a ser detectado. La etiqueta es cualquier molécula que produce o puede ser inducida para producir una señal, y puede ser, entre otros, un fluorescente, un radiomarcador, una enzima, un compuesto quimioluminiscente o un sensibilizador (incluidos los fotosensibilizadores), por ejemplo. Por lo tanto, la señal se detecta y/o mide detectando actividad enzimática, luminiscencia, absorbancia de luz o radiactividad, por ejemplo, dependiendo de la naturaleza de la etiqueta.

Las etiquetas adecuadas incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, compuestos quimioluminiscentes tales como ésteres de acridinio (incluidos los ésteres de acridinio que comprenden uno o más sustituyentes tales como, pero sin limitación, hexaetilenglicol, isopropiloxi y N-sulfopropilo, por ejemplo), luminol e isoluminol, por ejemplo; enzimas tales como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH") y peroxidasa de rábano picante; ribozima; un sustrato para una replicasa tal como QB replicasa; promotores colorantes fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina; complejos como los preparados a partir de CdSe y ZnS presentes en nanocristales semiconductores conocidos como puntos Cuánticos; sensibilizadores, incluidos fotosensibilizadores; coenzimas; sustratos enzimáticos; radiomarcadores como <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, <sup>57</sup>Co y <sup>75</sup>Se; por ejemplo.

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

Alternativamente, la etiqueta puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema de producción de señal incluiría todos los componentes necesarios para producir una señal medible. Tales otros componentes pueden incluir, por ejemplo, sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, consumidores, iones metálicos, oxidantes, ácidos, bases, tensioactivos, y una sustancia de unión específica requerida para la unión de sustancias generadoras de señal.

En algunos ejemplos, se emplea un compuesto quimioluminiscente como miembro sps. Un compuesto quimioluminiscente (quimioluminizador) es un compuesto que es químicamente activable y, como resultado de dicha activación, emite luz a una determinada longitud de onda. Ejemplos de quimioluminizadores, a modo de ilustración y sin limitación, incluyen ésteres de acridinio, olefinas capaces de reaccionar con oxígeno singlete o un peróxido para formar hidropéroxidos o dioxetanos, que pueden descomponerse en cetonas o derivados de ácido carboxílico; dioxetanos estables que pueden descomponerse por la acción de la luz; acetilenos que pueden reaccionar con oxígeno singlete para formar dicetonas; hidrazonas o hidrazidas que pueden formar azocompuestos o azocarbonilos tales

como luminol; y compuestos aromáticos que pueden formar endoperóxidos, por ejemplo. Como consecuencia de la reacción de activación, los quimioluminizadores causan directa o indirectamente la emisión de luz.

5 En algunos ejemplos, el método de ensayo es un inmunoensayo, que puede implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos no marcados generalmente comprenden la formación de complejos relativamente grandes que implican uno o más anticuerpos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitina y aglutinación y técnicas de dispersión de luz correspondientes tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpos. Los inmunoensayos etiquetados incluyen, entre otros, inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayos, inmunoensayos de inhibición, ensayos de luminiscencia inducida y ensayos de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo.

10 Un grupo general de inmunoensayos en donde se pueden emplear realizaciones de las presentes composiciones para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra incluye inmunoensayos usando una concentración limitada de uno de los reactivos del ensayo. Otro grupo de inmunoensayos implica el uso de un exceso de uno o más de los reactivos principales.

15 En un ensayo heterogéneo competitivo típico, un ejemplo de una composición de acuerdo con los principios descritos en el presente documento que comprende un miembro sbp que se une específicamente a un analito (por ejemplo, un anticuerpo para el analito) se pone en contacto con un medio que contiene la muestra sospechosa de contener el analito y el analito se conjugan con una etiqueta (análogo de analito marcado). El analito de la muestra y el análogo de analito marcado compiten por unirse al miembro sbp de la presente composición. Después de la separación magnética de la composición de acuerdo con los principios descritos en el presente documento desde el medio de ensayo, se examina la composición para determinar la cantidad de etiqueta unida al mismo. La activación de la etiqueta en la presente composición produce una señal de la etiqueta, que se determina mediante técnicas convencionales. La cantidad de la señal de la etiqueta es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra porque el análogo de analito marcado compite con el analito de la muestra para unirse al miembro sbp. Es decir, cuanto mayor es la cantidad de analito en la muestra, menor es la cantidad de análogo de analito marcado que se une a la composición actual y menor es la cantidad de señal observada.

20 En un ensayo sándwich no competitivo típico, se forma un complejo sándwich inmune en un medio de ensayo. El complejo comprende el analito, un miembro sbp (primer miembro sbp) de las presentes composiciones que se une al analito y un segundo miembro sbp que se une al analito. Posteriormente, se detecta el complejo inmunitario sándwich y está relacionado con la cantidad de analito en la muestra. El complejo sándwich inmune es detectado en virtud de la presencia en el complejo de una etiqueta del segundo miembro sbp.

30 Algunos ensayos conocidos utilizan un sistema de producción de señal que emplea miembros sps primero y segundo. Los miembros de sps pueden estar relacionados en que la activación de un miembro de sps produce un producto tal como, por ejemplo, luz, que da como resultado la activación de otro miembro de sps.

35 En una metodología en un ensayo de sándwich, se pone en contacto una primera incubación de la presente composición con un medio que contiene una muestra sospechosa de contener el analito. Después de una etapa de lavado y separación, el soporte de la presente composición se pone en contacto con un medio que contiene un segundo miembro sbp como, por ejemplo, un anticuerpo para el analito, que contiene una etiqueta como un compuesto quimioluminiscente o una enzima, para un segundo período de incubación. Las etiquetas están relacionadas en que la activación de una de las etiquetas activa la otra etiqueta si el analito está presente en el medio. El soporte se lava nuevamente y se separa del medio y se examina el medio o el soporte para detectar la presencia de una señal. La presencia y la cantidad de señal están relacionadas con la presencia o cantidad del analito.

40 En algunas realizaciones de ensayos conocidos, los miembros sps comprenden un sensibilizador tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador y una composición quimioluminiscente donde la activación del sensibilizador da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. El segundo miembro sps generalmente genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de miembro sps unido y/o no unido, es decir, la cantidad de miembro sps unido o no unido al analito que se está detectando o a un agente que refleja la cantidad del analito que va a ser detectado. De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la presente composición puede comprender uno de los reactivos sensibilizadores o el reactivo quimioluminiscente.

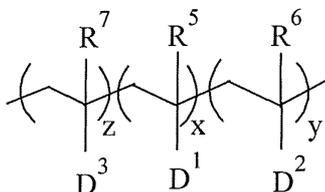
45 La concentración del analito que puede analizarse generalmente varía de aproximadamente  $10^{-5}$  a aproximadamente  $10^{-17}$  M, o de aproximadamente  $10^{-6}$  a aproximadamente  $10^{-14}$  M. Consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (en relación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

50 Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente estarán determinadas por el rango de concentración de interés del analito 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 en el rango. Es decir, una variación en la concentración de analito que sea significativa debería proporcionar una diferencia

de señal medible con precisión. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema productor de señal y la naturaleza de los analitos, por ejemplo, determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

5 Como se mencionó anteriormente, la muestra y los reactivos se proporcionan en combinación en el medio. Si bien el orden de adición al medio puede variar, habrá ciertas preferencias para algunas realizaciones de los formatos de ensayo descritos aquí. El orden más simple de adición es agregar todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene en la señal como en un ensayo homogéneo o separar una composición de acuerdo con los principios descritos en este documento mediante la aplicación de un campo magnético y examinar la composición para la presencia y/o cantidad de señal como en un ensayo heterogéneo. Alternativamente, cada uno de los reactivos, o grupos de reactivos, puede combinarse secuencialmente. En algunas realizaciones, puede implicarse una etapa de incubación posterior a cada adición como se discutió anteriormente. En ensayos heterogéneos, los pasos de lavado también pueden emplearse después de uno o más pasos de incubación.

10 En una realización, la presente invención es un método para determinar en una muestra uno o más de la presencia y cantidad de un analito. Se proporciona una combinación en un medio. La combinación comprende la muestra y una composición que comprende una partícula que comprende un miembro de un sistema productor de señal, un miembro del par de unión específico que se une al analito o a un segundo miembro sbp para formar un complejo relacionado con la presencia del analito y un recubrimiento de un copolímero. El copolímero tiene la fórmula:



en donde:

20 D<sup>1</sup> es -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-Z, -C(O)-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-CH(OH)-R<sup>1</sup> o un derivado del mismo, -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-N<sup>⊕</sup>(R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, o -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-O-PO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-N<sup>⊕</sup>(R<sup>11</sup>R<sup>12</sup>R<sup>13</sup>),

donde:

X es O o NR<sup>2</sup> en donde R<sup>1</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

Z es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

R<sup>2</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

25 m es de 1 a 100,

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

p es de 1 a 10,

q es de 1 a 10,

30 r es de 1 a 10,

s es de 1 a 10,

t es de 1 a 10, y

35 D<sup>2</sup> es -C(O)-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-G en donde A es O o NR en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y n es 1 a 10 y en donde G es CHO; CH(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> en donde R<sup>8</sup> es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; COOH o un derivado del mismo; OH; o un miembro de un par de unión específico;

D<sup>3</sup> es -COOH o un derivado del mismo;

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

40 x es 1 a aproximadamente 1000, o 1 a aproximadamente 800, o 1 a aproximadamente 600, o 1 a aproximadamente 400, o 1 a aproximadamente 200, o 1 a aproximadamente 100, o aproximadamente 5 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 5 a aproximadamente 800, o aproximadamente 5 a aproximadamente 600, o aproximadamente 5 a aproximadamente 400, o aproximadamente 5 a aproximadamente 200, o aproximadamente 5 a aproximadamente 100, o aproximadamente 10 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 10 a aproximadamente 800, o aproximadamente 10 a aproximadamente 600, o aproximadamente 10 a aproximadamente 400, o aproximadamente

10 a aproximadamente 200, o aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 50 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 50 a aproximadamente 800, o aproximadamente 50 a aproximadamente 600, o aproximadamente 50 a aproximadamente 400, o aproximadamente 50 a aproximadamente 200, o aproximadamente 50 a aproximadamente 100, o aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 100 a aproximadamente 800, o aproximadamente 100 a aproximadamente 600, o aproximadamente 100 a aproximadamente 400, o aproximadamente 100 a aproximadamente 200, por ejemplo ;

y es 1 a aproximadamente 1000, o 1 a aproximadamente 800, o 1 a aproximadamente 600, o 1 a aproximadamente 400, o 1 a aproximadamente 200, o 1 a aproximadamente 100, o aproximadamente 5 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 5 a aproximadamente 800 , o aproximadamente 5 a aproximadamente 600, o aproximadamente 5 a aproximadamente 400, o aproximadamente 5 a aproximadamente 200, o aproximadamente 5 a aproximadamente 100, o aproximadamente 10 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 10 a aproximadamente 800, o aproximadamente 10 a aproximadamente 600, o aproximadamente 10 a aproximadamente 400, o aproximadamente 10 a aproximadamente 200, o aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 50 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 50 a aproximadamente 800, o aproximadamente 50 a aproximadamente 600, o aproximadamente 50 a aproximadamente 400, o aproximadamente 50 a aproximadamente 200, o aproximadamente 50 a aproximadamente 100, o aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 100 a aproximadamente 800, o aproximadamente 100 a aproximadamente 600, o aproximadamente 100 a aproximadamente 400, o aproximadamente 100 a aproximadamente 200, por ejemplo ; y

z es de 1 a aproximadamente 1000.

Z puede ser 1 a aproximadamente 1000, o 1 a aproximadamente 800, o 1 a aproximadamente 600, o 1 a aproximadamente 400, o 1 a aproximadamente 200, o 1 a aproximadamente 100, o aproximadamente 5 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 5 a aproximadamente 800, o aproximadamente 5 a aproximadamente 600, o aproximadamente 5 a aproximadamente 400, o aproximadamente 5 a aproximadamente 200, o aproximadamente 5 a aproximadamente 100, o aproximadamente 10 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 10 a aproximadamente 800, o aproximadamente 10 a aproximadamente 600 , o aproximadamente 10 a aproximadamente 400, o aproximadamente 10 a aproximadamente 200, o aproximadamente 10 a aproximadamente 100, o aproximadamente 50 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 50 a aproximadamente 800, o aproximadamente 50 a aproximadamente 600, o aproximadamente 50 a aproximadamente 400, o aproximadamente 50 a aproximadamente 200, o aproximadamente 50 a aproximadamente 100, o aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, o aproximadamente 100 a aproximadamente 800, o aproximadamente 100 a aproximadamente 600, o aproximadamente 100 a aproximadamente 400, o aproximadamente 100 a aproximadamente 200, para ejemplo.

Métodos de ensayo particulares que utilizan ejemplos de las composiciones presentes

Como se mencionó anteriormente, las composiciones de acuerdo con los principios descritos aquí pueden emplearse en ensayos que utilizan partículas paramagnéticas. Un ejemplo particular de dicho ensayo es un inmunoensayo marcado con éster de acridinio que usa partículas paramagnéticas como fase sólida (inmunoensayo "ADVIA").

En un ejemplo de un inmunoensayo ADVIA, se emplea un sistema de detección que incluye un análogo de analito marcado con una molécula pequeña (unidad estructural de captura), un miembro sbp para la molécula pequeña unida a partículas de óxido de hierro paramagnético recubiertas con copolímero de acuerdo con los principios descritos en este documento como una fase sólida (SP) y un anticuerpo marcado con éster de acridinio específico para el analito (anticuerpo de detección). La molécula pequeña puede ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína y el miembro sbp respectivo para la molécula pequeña puede ser estreptavidina o anticuerpo para fluoresceína. El analito en una muestra de paciente compite con el análogo de analito marcado del resto de captura para unirse al anticuerpo antianalito de detección marcado con éster de acridinio. El ensayo puede llevarse a cabo en un aparato CENTAUR®, CENTAUR® XP o CENTAUR® CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante proporcionadas con el mismo. Después de un período de incubación apropiado, las partículas paramagnéticas se separan del medio de ensayo mediante la aplicación de un campo magnético. Las partículas paramagnéticas se examinan para determinar la cantidad de señal del anticuerpo antianalito marcado con éster de acridinio exponiendo las partículas paramagnéticas a un agente de activación para el éster de acridinio tal como, por ejemplo, uno o más de un ácido, un oxidante, una base y un tensioactivo.

En otro ejemplo de un inmunoensayo ADVIA, el sistema de detección empleado para este ejemplo de un ensayo incluye un anticuerpo marcado con una molécula pequeña para un analito (anticuerpo de captura), miembro sbp para la molécula pequeña unida a partículas de óxido de hierro paramagnético recubiertas con copolímero con los principios descritos en este documento como una fase sólida (SP) y un análogo de analito marcado con éster de acridinio (hapteno de detección). El analito en una muestra de paciente compite con el hapteno de detección marcado con éster de acridinio para unirse con el anticuerpo antianalito que está unido a las partículas paramagnéticas en virtud de la unión entre la molécula pequeña y el miembro sbp para la molécula pequeña. El ensayo puede llevarse a cabo en un aparato CENTAUR®, CENTAUR® XP o CENTAUR® CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante proporcionadas con el mismo. Después de un período de incubación apropiado, las partículas paramagnéticas se separan del medio de ensayo mediante la aplicación de un campo

magnético. Las partículas paramagnéticas se examinan para determinar la cantidad de señal del análogo de analito marcado con éster de acridinio exponiendo las partículas paramagnéticas a un agente de activación para el éster de acridinio.

5 Como se mencionó anteriormente, dependiendo de la naturaleza del ensayo empleado, el medio puede comprender además uno o más componentes tales como, por ejemplo, una molécula pequeña, una partícula adicional, miembros sps adicionales y agentes aglutinantes adicionales tales como uno o más sbp miembros (por ejemplo, anticuerpos), que son diferentes de los que forman parte de la presente composición. Además, una vez más, dependiendo de la naturaleza del ensayo empleado, otros reactivos también pueden incluirse en la combinación inicial o agregarse posteriormente.

#### 10 Paso de examen

En el siguiente paso de un método de ensayo, se examina el medio para detectar la presencia de un complejo que comprende el analito. Uno o ambos de la presencia y cantidad del complejo indica uno o ambos de la presencia y cantidad del analito en la muestra.

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

20 En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio. Una o ambas de la presencia y la cantidad de la señal están relacionadas con una o ambas de la presencia y la cantidad del analito en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza del sistema productor de señal. Como se discutió anteriormente, existen numerosos métodos por los cuales una etiqueta de un sistema productor de señal puede producir una señal detectable por medios externos. La activación de un sistema productor de señal depende de la naturaleza de los miembros del sistema productor de señal.

25 Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían de aproximadamente 10° a aproximadamente 70°C, o de aproximadamente 20° a aproximadamente 45°C, o de aproximadamente 20° a aproximadamente 25°C, por ejemplo. En un enfoque, las curvas estándar se forman utilizando concentraciones conocidas del analito. También se pueden usar calibradores y otros controles.

30 La luminiscencia o la luz producida a partir de cualquier etiqueta se puede medir visualmente, fotográficamente, actinométricamente, espectrofotométricamente o por cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad de la misma, que está relacionada con la cantidad de analito en el medio. El examen de una o ambas de la presencia y la cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente un paso en donde se lee la señal. La señal se lee normalmente utilizando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser un espectrofotómetro, fluorómetro, espectrómetro de absorción, luminómetro o quimioluminómetro, por ejemplo.

Kits que comprenden reactivos para realizar ensayos

40 Las realizaciones de las presentes composiciones y otros reactivos para realizar un ensayo particular para un analito pueden estar presentes en un kit útil para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito. En algunas realizaciones, un kit comprende en una combinación empaquetada una composición de acuerdo con los principios descritos aquí. En algunas realizaciones, dependiendo de la naturaleza de un ensayo, el kit también incluye un anticuerpo marcado con acridinio para el analito o un análogo de analito marcado con acridinio. El kit puede incluir además otros reactivos para realizar el ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular.

45 Los reactivos pueden estar en recipientes separados o pueden combinarse varios reactivos en uno o más recipientes, dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos empaquetados por separado para realizar un ensayo, como miembros sbp adicionales, miembros sps y reactivos auxiliares, por ejemplo.

50 Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que deben ocurrir durante los presentes métodos y para optimizar sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse como un polvo seco, generalmente liofilizado, incluidos los excipientes, que en la disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo utilizando realizaciones de las presentes composiciones. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método como se describió anteriormente.

55

Definiciones

Se proporcionan las siguientes definiciones para términos y expresiones que de otro modo no se definieron de manera específica anteriormente.

5 La expresión "al menos" como se usa en el presente documento significa que el número de elementos especificados puede ser igual o mayor que el número citado.

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

10 Las designaciones "primer", "segundo" y "tercero" se usan únicamente con el fin de diferenciar entre dos o más elementos tales como, por ejemplo, "primer miembro sps" y "segundo miembro sps" o "primer monómero polimerizado". "segundo monómero polimerizado" y "tercer monómero copolimerizado" y no pretenden implicar ninguna secuencia u orden o importancia para un elemento sobre otro o cualquier orden de adición, por ejemplo.

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

15 **Ejemplos**

Materiales:

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

Abreviaturas:

20	BSA	albúmina de suero bovino
	BgG	gammaglobulina bovina
	TG	tiroglobulina bovina monomérica
	T4	tiroxina
	DMSO	dimetilsulfóxido
25	AIBN	azobis(isobutironitrilo)
	PEG	poli(etilen glicol)
	MPEG	monometoxi-poli(etilenglicol)
	NaCNBH <sub>3</sub>	cianoborohidruro de sodio
	MAMDMA	metacrilamidoacetaldehído dimetil acetal
30	HEMA	2-hidroxietilmetacrilato
	THF	tetrahidrofurano
	HCl	ácido clorhídrico
	OH	grupo hidroxilo
	NaOH	hidróxido de sodio
35	Regulador de acetato	regulador de acetato de sodio 0.1 M ácido acético pH 5.
	DMF	dimetilformamida
	DMAP	4-N,N-dimetilaminopiridina
	MA.Actl	Metacrilamidoacetaldehído
	DSC	carbonato de disuccinimidilo
40	BCA	ácido bicinconínico

	ANS	ácido anilinoftalenosulfónico
	UPA	Analizador de ultrapartículas
	hr(s)	hora(s)
	min	minutos
5	DI	desionizada
	p/p	peso a peso
	rpm	rotaciones por minuto
	mL	mililitros
	mg	miligramos
10	g	gramos
	mM	milimolar
	TA	temperatura ambiente
	Da	daltons
	kDa	kilodaltons
15	nd	no determinado

## Preparación de reactivos

**Ejemplo 1: Síntesis de MAMDMA (Figura 1):** Se colocaron ácido metacrílico (9.0 g, 0.1 moles) y N-hidroxisuccinimida (11.5 g, 0.1 moles) en un matraz de fondo redondo y se disolvieron en 300 mL de THF. La solución se enfrió en un baño de hielo. Se añadió dicitclohexil carbodiimida (21.0 g, 0.1 moles) disuelto en 50 mL de THF. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas en un baño de hielo. Se añadieron aminoacetaldehído dimetil acetal (15.0 g, 0.1 moles) y trietilamina (15.0 g, 0.15 moles). La mezcla de reacción se solidificó en una torta y se volvió difícil de agitar debido a esta adición. Se añadieron 300 mL adicionales de THF. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 3 días. La mezcla de reacción se filtró para eliminar los sólidos precipitados. La solución transparente se concentró a presión reducida. MAMDMA se obtuvo como un líquido viscoso. Rendimiento: 20.0 g, 90%. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 5.4 δ 1H, 5.6 δ 1H (protones de doble enlace), 3.5 δ 6H (protones acetales) 3.1 δ 1H (-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.5 δ 2H (-CH<sub>2</sub>-CH-), 2.3 δ 1H (-NH-), 1.8 δ 3H (=C-CH<sub>3</sub>).

**Ejemplo de referencia 2:** Síntesis de poli(ácido acrílico-co-metacrilamidoacetaldehído) (poli(ácido acrílico-co-MA-ActI)) (Figura 2):

Preparación de poli(ácido acrílico-co-MAMDMA). En un matraz de fondo redondo equipado con una entrada y salida de gas argón, se disolvieron 2.5 g de MAMDMA preparado como se describe anteriormente, 1.1 g de ácido acrílico (AA), 0.07 g de AIBN (MAMDMA:AA:AIBN 1:1:0.03) en 60 mL. DMSO El gas argón se purgó a través de solución de DMSO a temperatura ambiente durante 30 minutos. El matraz que contenía la solución de monómero se sumergió en un baño de aceite precalentado a 80°C. La polimerización se realizó a 80°C durante 16 horas bajo purga de argón. La solución de polímero se vertió en 700 mL de éter dietílico para precipitar el polímero. El polímero se disolvió en 300 mL de agua y se concentró hasta 32.5 mL usando copas de filtro CENTRICON® Plus-70 que tenían un corte de peso molecular de 3,000 Da a 4°C a 4000 rpm durante 3 veces a 45 minutos cada una. Rendimiento total del polímero después de la purificación = 1.61 g.

Hidrólisis de los grupos acetal del poli(ácido acrílico-co-MAMDMA) para formar poli(ácido acrílico-co-MA-ActI). Se añadió una solución de 1.61 g de poli(ácido acrílico-co-MAMDMA) anterior en 32.5 ml de agua a 40 ml de agua HCl 1N. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 36 horas. Luego, el pH de la solución se ajustó a 5.0 usando NaOH 10N, HCl y ácido acético. La solución de polímero de pH 5.0 (280 ml) se concentró a 70 ml por centrifugación en un recipiente de filtración CENTRICON® Plus-70 con un límite de peso molecular de 3,000 a 4°C a 4000 rpm durante 2 veces 45 min. La solución final de 37.5 ml obtenida como retenido se almacenó a 4°C. Se determinó el contenido de sólidos de la solución de polímero hidrolizado. Rendimiento total del polímero después de la purificación = 2.08g (quedó algo de sal en solución después de la diafiltración). La solución de polímero se almacenó a 4°C.

Preparación de partículas paramagnéticas (PMP) recubiertas con poli(ácido acrílico-co-MA-ActI)- estreptavidina (Figura 2): La solución de partículas paramagnéticas de alquilamina (PMP) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las PMP de alquilamina eran partículas paramagnéticas que tenían un núcleo de óxido de Fe (II) y óxido de Fe (III) y un recubrimiento de grupos amina que contenían polisiloxano en la superficie. Las PMP se prepararon coprecipitando primero las sales de Fe (II) y Fe (III) en presencia de una base y completando la oxidación calentando

las partículas precipitadas seguido de poner en contacto las partículas de óxido con una amina que contiene polisiloxano. Se tomaron alícuotas (50 mg) de PMP (51.3 mg/mL) para cada lote, totalizando seis lotes. Las PMP se lavaron 3 veces (35 mL por lavado) con  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0.02M pH 7.75. El poli(AA-co-MA-ActI) (282 mg) preparado como se describió anteriormente se combinó con cada una de las partes alícuotas lavadas de 50 mg de PMP. Luego, el pH de cada lote se ajustó de aproximadamente 5.5 a 8.6 +/- 0.1 usando  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1M, pH 9.5. La suspensión de PMP más polímero se incubó a 25°C durante 3 horas. Las PMP recubiertas con polímero se separaron magnéticamente y se eliminó la solución sobrenadante. De esta manera, las PMP recubiertas con polímero se lavaron 3 veces (35 mL por lavado) con  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0.02M pH 7.75. El lavado se realizó balanceando a 25°C durante 3 horas. Después de la decantación en el lavado final, cada lote/alícuota de PMP recibió una cantidad única de estreptavidina (45, 90, 135, 200, 300 y 500 mg, respectivamente). Las soluciones de estreptavidina se disolvieron cada una en 3 mL de regulador de acetato 0.1 M pH 5.0. Luego, las soluciones de copolímero-estreptavidina PMP (copolímero SAV-PMP) se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 30 mg de  $\text{NaCNBH}_3$  a cada uno, seguido de balanceo durante la noche a 25°C. El sobrenadante se decantó y las PMP se lavaron 3 veces usando  $\text{NaCl}$  1 M, pH 7.0. A continuación, el copolímero SAV-PMP se lavó 2 veces con un regulador ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  50 mM,  $\text{NaCl}$  150 mM,  $\text{NaN}_3$  15 mM pH 7.4). Luego, el SAV-copolímero-PMP se resuspendió con ~3 mL del mismo regulador. Finalmente, se determinó el contenido de sólidos, se realizó el ensayo BCA en los sobrenadantes iniciales y posteriores a la reacción obtenidos para determinar la concentración de proteína en las perlas, y se midió el tamaño de partícula (MICROTRAC® UPA) a 0.2 mg/mL. La carga de estreptavidina en el SAV-copolímero-PMP aumentó de 0.25-1.5 mg /mg a medida que la cantidad de proteína desafiada aumentó de 45-500 mg. El tamaño de partícula del SAV-copolímero -PMP fue de ~2 micras.

**Ejemplo 3:** Preparación de un copolímero con tres monómeros copolimerizados (poli(HEMA-co-AA-co-MA-ActI) (Figura 3): En un matraz de fondo redondo equipado con una entrada y salida de gas argón, se disolvieron 3.4 g de MAMDMA, 2.6 g de HEMA, 1.4 g de ácido acrílico, 0.1g de AIBN en 100 mL de acetonitrilo y 100 mL de agua. Se purgó gas argón a través de la solución a temperatura ambiente durante 30 minutos. El matraz que contenía la solución de monómero se sumergió en un baño de aceite precalentado a 80°C. La polimerización se realizó a 80°C durante 16 horas bajo purga de argón usando un condensador de reflujo para evitar la evaporación del disolvente. Luego, la solución de polímero se concentró *al vacío* para eliminar el acetonitrilo. La solución acuosa de polímero se diluyó a 500 ml y se añadieron 50 mL de HCl 5N. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. Hubo una precipitación significativa de polímero como se evidencia por una masa blanca precipitada. Los sólidos se separaron por centrifugación a 300 rpm durante 20 minutos a 4°C. Luego, la mezcla de reacción se enfrió a 4°C durante 1 hora y el pH se ajustó a 5.2 usando  $\text{NaOH}$  10 N y ácido acético glacial. La solución se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos a 4°C. La solución transparente se decantó y se concentró de 500 mL a 20 mL usando tazas de diafiltración CENTRICON® con un límite de peso molecular de 3000. Se determinó el contenido de sólidos en solución de polímero concentrado/diafiltrado. El rendimiento del polímero recuperado fue de 1.584 g.

**Ejemplo 4:** Preparación de PMP recubiertas con poli(HEMA-co-AA-co-MA-ActI), conjugado con biotina a través de hidroxilos sobre copolímero, y estreptavidina capturada sobre el mismo (Figura 4):

Recubrimiento de PMP con poli(HEMA-co-AA-co-MA-ActI) y activación de OH por DSC (PMP activadas por DSC): 100 mg de PMP (preparado como se describe anteriormente) y 400 mg de poli(HEMA-co-AA-co-MA-ActI) (preparado como se describe anteriormente) en 5 mL de solución de regulador de acetato 0.1M, pH 5.0, se mezclaron entre sí. El pH se ajustó a 8.0-8.5 usando carbonato de sodio y HCl. La suspensión se sacudió suavemente a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, se añadieron 90 mg de  $\text{NaCNBH}_3$  y la solución se dejó balancear a 25°C durante la noche. Luego, las PMP se lavaron tres veces con 40 ml de regulador de fosfato de sodio 0,02 M, pH 7,2, dos veces con 50 ml de agua DI y luego tres veces con 40 mL de DMF. Luego, se añadieron 40 mL de DMF y las PMP se transfirieron a un matraz de fondo redondo de 25 mL. A esto se añadieron 500 mg de DSC y 50 mg de DMAP y la mezcla de reacción se agitó a TA durante aproximadamente 48 horas. Las PMP se separaron magnéticamente y se eliminó la DMF.

Conjugación de biotina-hidrazida a PMP activadas por DSC (PMP biotiniladas activadas por DSC): a las PMP anteriores se añadieron 50 mg de biotina-hidrazida en 30 mL de regulador de fosfato de sodio 0.02 M, pH 7.7, y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, las PMP se separaron magnéticamente y se lavaron tres veces con 40 mL de regulador de fosfato de sodio 50 mM pH 7.0.

Captura de estreptavidina en PMP biotiniladas: Las PMP biotiniladas activadas por DSC anterior se suspendió en 15 mL de regulador fosfato pH 7.0 (50 mM) que contenía 15 mg de estreptavidina. La suspensión se mantuvo a 25°C en un oscilador durante la noche. Se recogió el sobrenadante y se estresó estreptavidina-PMP tres veces con 40 mL de regulador fosfato pH 7.0 y luego se suspendió en 10 mL de regulador fosfato. Se encontró proteína insignificante en el sobrenadante, lo que indica que los 15 mg de estreptavidina se unieron a las PMP activadas por DSC.

**Ejemplo de referencia 5:** Preparación de poli(MPEG1100-MA-co-MA-ActI) y poli(MPEG300-MA-co-MA-ActI) (Figura 5), poli(sulfobetaine-MA-co-MA-ActI) (Figura 6) y poli(AA-co-MA-ActI) (Figura 7):

Procedimiento para la polimerización de MAMDMA con diferentes monómeros: En un matraz de fondo redondo equipado con entrada y salida de gas Argón, MAMDMA (0.01M), monómero hidrofílico (0.01 moles) y AIBN (0.0001 moles,  $[\text{Monómero}]/[\text{AIBN}] = 200$ ) se disolvieron en 30 mL de DMSO. El gas argón se purgó a través de la solución

DMSO a temperatura ambiente durante 30 minutos. El matraz que contenía la solución de monómero se sumergió en un baño de aceite precalentado a 80°C. La polimerización se realizó a 80°C durante 16 horas bajo purga de argón. La solución de DMSO se vertió en 700 mL de éter dietílico para precipitar el polímero. El polímero se disolvió en 100 mL de agua y se concentró hasta 10-15 mL usando una membrana de ultrafiltración de peso molecular cortada con 5,000 Da.

Procedimiento para la hidrólisis de grupos acetal para obtener copolímeros sintéticos que contienen aldehído: se tomó una solución acuosa (100 mL) que contenía 2-3 g de copolímero sintetizado como se indicó anteriormente en un matraz Erlenmeyer. A esto, se añadieron 100 mL de HCl 1N. La solución ácida se agitó durante 2 días a temperatura ambiente; el pH de la solución se ajustó a 5.0 con la adición de NaOH concentrado y ácido acético. La presencia de grupos aldehído en el copolímero se confirmó cualitativamente mediante un ensayo con Purpald (Dickinson, R.G.; Jacobsen, N.W., Chemical Communications, p. 1719 (1970)). La solución de copolímero se concentró a 10 mL usando una membrana de ultrafiltración de corte de peso molecular 5,000 daltons. Las soluciones acuosas de polímeros (100-150 mg de sólidos/mL) se almacenaron a 4°C. Los diferentes copolímeros preparados se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1

Caracterización del peso molecular de los copolímeros que contienen aldehídos		
Polímero	MW (Da)	Índice de polidispersidad
Poli(sulfobetaina-co-MA-ActI) (1:1)	155,800	1.57
Poli(MPEG <sub>1100</sub> -MA-co-MA-ActI) (1:1)	65,990	4.5
Poli(AA-co-MA-ActI) (1:1)	22,490	1.34
Poli(MPEG <sub>300</sub> -MA-co-MA-ActI) (1:1)	nd	nd

**Ejemplo de referencia 6:** Preparación de PMP recubiertas con copolímeros y anti-FITC conjugado con copolímeros (PMP recubiertas con copolímero-conjugados anti-FITC) (Figura 8).

Síntesis de PMP estresadas por calor, recubiertas con copolímeros sintéticos y anti-FITC: El término "PMP estresadas por calor" se refiere a PMP (que tienen un recubrimiento de copolímero y miembro sbp) que han sido puestas en contacto con un regulador (como, por ejemplo, un regulador de fosfato que contiene BSA y BgG) (regulador de estrés térmico) a una temperatura superior a la temperatura ambiente (como, por ejemplo, una temperatura superior a 40°C o superior a 50°C o superior a 60°C) durante un período de tiempo (como, por ejemplo, aproximadamente 16 a aproximadamente 48 horas, o aproximadamente 16 a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas). Se tomaron PMP (100 mg en 2 mL) en cada uno de los tres tubos Falcon. A cada tubo, se añadieron 10 ml de regulador fosfato 0.02 M pH 7.4 y se mezclaron bien durante 30 minutos en una placa giratoria. Luego, las partículas se separaron magnéticamente y se decantó el regulador fosfato. Se añadió regulador fosfato nuevo y las PMP se lavaron como se indicó anteriormente y se separaron magnéticamente.

A cada preparación de PMP anterior se añadieron 6 ml de solución de copolímero (100-150 mg/ml) y el pH se ajustó a 8.5 usando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M. Los tubos se mantuvieron en un oscilador a 25°C durante 3 horas. Los copolímeros utilizados fueron: poli(MPEG<sub>300</sub>-MA-co-MA-ActI), poli(MPEG<sub>1100</sub>-MA-co-MA-ActI) y poli(sulfobetaina-MA-co-MA-ActI). Las PMP recubiertas con copolímero se lavaron dos veces usando 12 ml de regulador fosfato 0.02 M pH 7.4 como se describió anteriormente.

A cada preparación de PMP recubiertas con copolímero se añadieron 6 ml de anti-FITC (5 mg/ml, 30 mg en total) en regulador fosfato 0.02 M pH 7.7. Las partículas se mezclaron suavemente durante 30 minutos y se añadieron 30 mg de NaCNBH<sub>3</sub> y la mezcla se mantuvo en un oscilador a 25°C durante 16 horas.

Luego, los conjugados de PMP recubiertas con copolímero-anti-FITC se separaron magnéticamente y el sobrenadante se conservó para la determinación del contenido de proteína restante. Las PMP se lavaron dos veces con 12 ml de regulador fosfato como se describió anteriormente. Luego, las PMP se lavaron dos veces con 12 ml de regulador de lavado de proteínas (regulador fosfato 50 mM que contenía NaCl 150 mM y BSA y BgG, pH 7.4). Finalmente, las PMP se incubaron con 12 ml de cada regulador de lavado de proteínas a 50°C durante 16 horas mientras se mezclaban suavemente en un oscilador.

Las PMP estresadas por calor se dejaron enfriar a 25°C y se separaron magnéticamente. Las PMP estresadas por calor se lavaron dos veces con 12 ml de regulador de lavado de proteínas y una vez con 12 ml de regulador de

almacenamiento de proteínas (regulador de lavado de proteínas que contiene azida de sodio) como se describió anteriormente. Finalmente, las PMP estresadas por calor se suspendieron en 10 ml de regulador de almacenamiento de proteínas y se mantuvieron a 4°C hasta su uso posterior. La carga anti-FITC en las PMP se determinó a partir de la diferencia en la concentración de proteína medida antes y después de la conjugación de las PMP. Los datos de carga anti-FITC obtenidos del ensayo BCA y la gráfica estándar de BSA se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Descripción	Anti-FITC agregado (mg)	Anti-FITC recuperado (mg)	Anti-FITC unido (mg/mg)	Eficiencia de conjugación (%)
PMP recubiertas con poli(MPEG300-MA-co-MA-Actl) y Anti-FITC	30	21	0.09	30
PMPPMP recubiertas con poli(MPEG1100-MA-co-MA-Actl) y Anti-FITC	30	16.6	0.134	44
PMPPMP recubiertas con poli(sulfo betaína-MA-co-MA-Actl) y Anti-FITC	30	15.5	0.145	48

Síntesis de PMP no estresadas por calor recubiertas con copolímeros sintéticos y anti-FITC: Se recubrieron PMP con copolímeros y anti-FITC como se describió anteriormente en el Ejemplo 6, excepto que no se realizó estrés térmico de las PMP.

**Ejemplo de referencia 7:** Preparación de PMP recubiertas con copolímero y BgG y TG (Figura 9).

Preparación de poli(MPEG1100-MA-co-MA-Actl): MAMDMA (2.5g, 0.014M), MPEG1100-MA (6.25 g, 0.005 M), AIBN (62.6 mg, 0.00037 M) y DMSO (31.3mL) se colocaron en un matraz de fondo redondo de 250 mL equipado con entrada y salida de gas argón. La mezcla se purgó con argón durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. El matraz se colocó en un baño de aceite precalentado a 80°C con agitación. La polimerización se realizó a 80°C durante 16 horas bajo purga continua de argón. El medio DMSO anterior se vertió en 700 mL de éter dietílico y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente para precipitar el polímero, que era poli(MPEG1100-MA-co-MAMDMA). El sobrenadante, que contenía éter dietílico, se decantó. El polímero se disolvió en 200 mL de agua desionizada (DI) y se purificó por ultrafiltración (AMICON® CENTRICON®, Millipore Corporation, Billerica, MA) dos veces usando una membrana de peso molecular cortada de 30 kDa. El polímero se diluyó hasta un contenido sólido de 45 mg/mL en agua desionizada, que ascendió a 5.4 g en 120 mL. Esta solución de polímero (2.7 g) se mezcló con 200 mL de agua DI y 20 mL de HCl 5 N, y la mezcla se agitó a TA durante 48 horas. El pH se ajustó a 5.0 usando NaOH y ácido acético. El polímero final tenía un contenido sólido de 77 mg/mL en agua DI, que ascendía a aproximadamente 3g. Parte de este contenido de sólidos consistía en NaCl y acetato de sodio. El polímero se almacenó a 2-8°C.

Preparación de PMP-poli(MPEG1100-co-MA-Actl)-BgG/TG: La solución de PMP (PMP en agua DI) se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se tomaron alícuotas de 600 mg de PMP. Las PMP se lavaron 3 veces (40 ml por lavado) con Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 M, pH 7.75. Se formó una solución de PMP-polímero combinando 81 ml (6.48 g) de poli(MPEG1100-co-MA-Actl) con una alícuota lavada de 600 mg de PMP. Luego, el pH de la solución de PMP-polímero se ajustó de ~5.5 a 8.5 +/- 0.1 usando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M, pH 9.5. La solución se sacudió a 25°C durante 3 horas. Las PMP se lavaron 3 veces (40 ml por lavado) con Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 M, pH 7.75. Después de decantar el lavado final, se combinaron 600 mg de TG y 1200 mg de BgG en 30 ml de regulador de acetato 0.1 M pH 5.0 (solución de proteína 60 mg/ml) y se añadieron a la solución de PMP-polímero. Luego, la solución de PMP-polímero-TG/BgG se sacudió a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 360 mg de NaCNBH<sub>3</sub> y la solución se agitó durante la noche a 25°C. El sobrenadante inicial se decantó y las PMP se lavaron 3 veces usando NaCl 1M. El ensayo BCA se realizó para determinar la concentración de proteína en los sobrenadantes antes y durante los lavados con NaCl. A continuación, las perlas se lavaron 2 veces con Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, NaN<sub>3</sub> 15 mM, pH 7.4. Las PMP se resuspendieron luego con aproximadamente 45 ml del mismo regulador y se filtraron a través de una malla de 41 um. Finalmente, se determinó el contenido de sólidos junto con el tamaño de partícula (MICROTRAC® UPA a 0.2 mg/ml). Los resultados fueron los siguientes: 13.4 mg/ml, concentración final x 43 ml = rendimiento final de 576 mg; 0.69 mg de proteína (BgG/TG) unida por mg de PMP; tamaño de partícula de 0.51 (45%) y 2.38 (55%) micras.

Ensayos

**Ejemplo 8:** Ensayo de T4 utilizando PMP recubiertas con poli(HEMA-co-AA-co-MA-Actl): Todos los ensayos T4 se realizaron en un aparato CENTAUR® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) (Siemens). Los detalles del ensayo fueron los siguientes: PMP-poli(HEMA-co-AA-co-MA-Actl)-Biotina-estreptavidina PMP se diluyeron a 132 µg/mL al agregar 16.5 mL de partículas a 483.5 mL de regulador T4 en fase sólida (barbital sódico 50 mM, 150 mg/L

de ANS de amonio, PROBUMIN® al 0.25%, BgG al 0.002%, fosfato de sodio monohidrato monobásico 50 mM, 0.44 g/L de EDTA tetrasódico, 0.5 mL/L de suero de ratón, azida de sodio al 0.1%, pH final 6.00). Los paquetes de reactivos se prepararon agregando 25 ml de reactivo en fase sólida preparado para el Canal-S del CENTAUR® ReadyPack (un contenedor que almacena diferentes reactivos de ensayo utilizados en el ensayo), mientras que el reactivo Lite comercial (anti T4-2',6'-dimetilcarbonilfenilo-10-sulfopropilacridinio-9-carboxilato conjugado de éster 4'-NHS (Anti-T4-NSP-DMAE-NHS) y se utilizó reactivo de pozo auxiliar en sus respectivos pozos en el ReadyPack.

Las curvas de calibración se establecieron ejecutando estándares T4 en un instrumento CENTAUR® para cada condición experimental de reactivo utilizada para la estabilidad sobre la marcha. El experimento de estabilidad sobre la marcha se realizó durante 28 días. Los puntos de prueba se realizaron los días 0, 4, 8, 12, 17, 20, 24 y 28. Las PMP, las muestras (que contienen T4, detalles a continuación) y el conjugado anti-T4-NSP-DMAE-NHS se incubaron durante una cantidad de tiempo específica del método, se separaron magnéticamente, y el éster de acridinio en complejo separado fue activado por un activador y el instrumento registró la luz emitida. Los resultados obtenidos se convirtieron en % de recuperación de la señal original antes del inicio del experimento de estabilidad sobre la marcha. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3. El porcentaje (%) de recuperación de 100 +/- 10% se consideró indicativo de la estabilidad sobre la marcha de PMP recubiertas con copolímero. Las muestras analizadas fueron las siguientes:

CA76HB = 21.6 µg/dL T

CA76LB = 3.71 µg/dL T

K40781 = 9.11 µg/dL T

K40782 = 11.3 µg/dL T

K40783 = 15.6 µg/dL T

Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

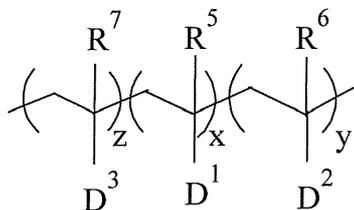
ID de muestra (Unidades conc.)	% De Recuperación						
	Día 4	Día 8	Día 12	Día 17	Día 20	Día 24	Día 28
CA76HB (21.6 µg/dL)	104.5%	99.7%	102.9%	107.9%	104.0%	102.9%	108.3%
CA76LB(3.71 µg/dL)	90.0%	113.3%	106.3%	105.8%	104.2%	107.0%	106.9%
K40781 (9.11 µg/dL)	102.9%	105.8%	101.6%	105.3%	102.6%	102.5%	105.7%
K40782 (11.3 µg/dL)	101.1%	103.4%	103.2%	107.6%	101.0%	101.0%	104.9%
K40783 (15.6 µg/dL)	99.3%	104.2%	101.2%	106.0%	99.9%	103.9%	102.0%

**Ejemplo 9:** Ensayo de folato utilizando PMP recubiertas con poli(HEMA-co-AA-co-MA-ActI)-Biotina-Estreptavidina: Todos los ensayos de folato se realizaron en un aparato CENTAUR® (Siemens). Los detalles del ensayo fueron los siguientes: PMP-poli(HEMA-co-AA-co-MA-ActI)-Biotina-Estreptavidina se diluyeron a 200 µg/mL agregando 899 µL de perlas a 39.101 mL de regulador (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 250 mM, 0.1% de BSA modificado con sulfhidrilo, Triton®-X-100 al 0.1%, Proclin-300 al 0.05%, pH 7). Luego se prepararon ocho alícuotas de 4.5 mL de 200 µg/mL de PMP-poli(HEMA-co-AA-co-MA-ActI)-Biotina-Estreptavidina en tubos de polipropileno de 5 mL (con juntas y roscas internas), los cuales luego fueron sometidos a Parafilm. Los tubos se dividieron en 4 pares, que representan 4 condiciones de prueba. Un tubo de cada par se intercambió con regulador con fosfato de sodio 50 mM, NaCl 140 mM, BSA al 0.1%, Triton® X-100 al 0.1%, regulador de pH 7.2 después de la prueba de esfuerzo, mientras que el otro no. Los tubos se incubaron a 4°C (condición de control) o 45°C (condición de prueba) durante cantidades variables de tiempo. El día 21, un tubo de cada par se intercambió con regulador con fosfato de sodio 50 mM, NaCl 140 mM, BSA al 0.1%, Triton® X-100 al 0.1%, regulador pH 7.2 por separación magnética seguido de aspiración al vacío del medio líquido. Luego se añadieron 4.5 mL de regulador de almacenamiento a 4°C a los tubos intercambiados con regulador. Las ocho muestras se analizaron en un analizador de inmunoquímica Siemens Centaur® XP.

Para la prueba, se colocaron muestras de PMP-poli(HEMA-co-AA-co-MA-ActI)-Biotina-Estreptavidina en el pozo de fase sólida de un Centaur® ReadyPack (un contenedor que almacena diferentes reactivos de ensayo utilizados en el ensayo), mientras que el reactivo Lite comercial (éster de Folato-succinimidil-diaminoetil-DMAE) y el reactivo de pocillo auxiliar se usaron en sus respectivos pocillos. Luego, cada uno de los ocho paquetes se usó para analizar seis muestras de suero (por triplicado) con valores conocidos de folato de 2.24, 3.69, 7.65, 11.81, 19.45 y 31.19 ng/mL, para generar valores medios de señal en Unidades de Luz Relativas (ULR) para cada muestra en cada condición. La muestra, el reactivo Lite y las PMP se incubaron durante 7 minutos, y las PMP se separaron magnéticamente y se trataron con un reactivo activador para activar el éster de acridinio para emitir luz. La luz emitida fue medida por el instrumento Centaur® y los resultados fueron proporcionados por el sistema informático del instrumento. Los resultados obtenidos se interpretaron gráficamente como % de recuperación frente al tiempo y se representan en la Figura 10.

REIVINDICACIONES

1. Un copolímero aleatorio que consta de tres monómeros copolimerizados y que tiene la fórmula:



en donde:

- 5 D<sup>1</sup> es -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-Z, -C(O)-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-CH(OH)-R<sup>1</sup>, o un derivado del mismo, -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-N<sup>⊕</sup>(R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)-(CH<sub>2</sub>)-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, o -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-O-PO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>N<sup>⊕</sup>(R<sup>11</sup>R<sup>12</sup>R<sup>13</sup>)

donde:

X es O o NR<sup>2</sup> en donde R<sup>1</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

Z es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

- 10 R<sup>2</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

m es de 1 a 100,

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono,

p es de 1 a 10,

- 15 q es de 1 a 10,

r es de 1 a 10,

s es de 1 a 10,

t es de 1 a 10, y

D<sup>2</sup> es

- 20 (a) -C(O)-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-G en donde A es O o NR en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y n es 1 a 10 y en donde G es CHO; CH(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> en donde R<sup>8</sup> es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; COOH o un derivado del mismo; OH; o un miembro de un par de unión específico; o

(b) -OC(O)NR-J en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y J es un miembro de un par de unión específico; y;

- 25 D<sup>3</sup> es -COOH o un derivado del mismo;

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

x es de 1 a aproximadamente 1000;

y es de 1 a aproximadamente 1000; y

z es de 1 a aproximadamente 100

- 30 en donde la distribución de los monómeros copolimerizados puede ser tal que en cualquier punto de la cadena polimérica un primer monómero copolimerizado, un segundo monómero copolimerizado y un tercer monómero copolimerizado se alternan o repiten a diferencia de los copolímeros de bloque.

2. El copolímero de acuerdo con la reivindicación 1 en donde:

A es NR en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

- 35 n es de 1 a 10;

G es CHO; CH(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> en donde R<sup>8</sup> es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; o un miembro de un par de unión específico;

D<sup>1</sup> es -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>-Z, en donde Z es H o metilo y m es 1 a 100;

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

x es de 1 a aproximadamente 1000;

y es de 1 a aproximadamente 1000; y

5 z es de 1 a aproximadamente 1000.

3. El copolímero de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

A es NR en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

n es de 1 a 10;

G es CHO; CH(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> en donde R<sup>8</sup> es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; o un miembro de un par de unión específico;

10 D<sup>1</sup> es -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-N<sup>⊕</sup>(R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, en donde R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, q es de 1 a 10 y r es de 1 a 10;

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

x es de 1 a aproximadamente 1000;

y es de 1 a aproximadamente 1000; y

15 z es de 1 a aproximadamente 1000.

4. El copolímero de acuerdo con la reivindicación 1 en donde:

A es NR en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

n es de 1 a 10;

G es CHO; CH(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> en donde R<sup>8</sup> es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; o un miembro de un par de unión específico;

20 D<sup>1</sup> es -C(O)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-O-PO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-N<sup>⊕</sup>(R<sup>11</sup>R<sup>12</sup>R<sup>13</sup>), en donde s es de 1 a 10 y t es de 1 a 10;

R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> y R<sup>13</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

x es de 1 a aproximadamente 1000;

y es de 1 a aproximadamente 1000; y

25 z es de 1 a aproximadamente 1000.

5. El copolímero de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

A es NR en donde R es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

n es de 1 a 10;

G es CHO; CH(OR<sup>8</sup>)<sub>2</sub> en donde R<sup>8</sup> es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; o un miembro de un par de unión específico;

30 D<sup>1</sup> es -C(O)-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-C(OH)-R<sup>1</sup>, en donde R<sup>1</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, X es NR<sup>2</sup> en donde R<sup>2</sup> es H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y p es de 1 a 10,

D<sup>3</sup> es -COOH o un derivado del mismo;

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente H o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono;

x es de 1 a aproximadamente 1000;

35 y es de 1 a aproximadamente 1000; y

z es de 1 a aproximadamente 1000.

6. Una composición para usar como reactivo de ensayo, comprendiendo la composición:

un soporte sólido paramagnético que comprende un recubrimiento de un copolímero sintético de acuerdo con la reivindicación 1.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el soporte sólido paramagnético es una partícula.

5 8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la partícula es una partícula de óxido metálico en donde el metal es un metal paramagnético seleccionado del grupo que consiste en hierro, cromo, litio, sodio, magnesio, aluminio, manganeso, estroncio, zirconio, molibdeno, rutenio, rodio, paladio, estaño, samario, europio, tungsteno y platino.

9. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en donde un miembro de un par de unión específico está asociado con el soporte sólido.

10 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el miembro del par de unión específico es un anticuerpo, un antígeno, un hapteno o una molécula pequeña.

11. Un método para determinar en una muestra la presencia y/o cantidad de un analito, comprendiendo el método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

(i) la muestra,

15 (ii) la composición de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el miembro del par de unión específico se une al analito o a un miembro de un par de unión específico que se une al analito para formar un complejo relacionado con la presencia del analito, y

(iii) un miembro de un sistema productor de señal (A) unido a un miembro de un par de unión específico que se une al analito o (B) unido a un análogo de analito,

20 (b) someter la combinación a condiciones para formar el complejo,

(c) separar el soporte sólido del medio, y

(d) activar el miembro del sistema productor de señal y detectar la cantidad del complejo, estando relacionada la cantidad del complejo con la presencia y/o cantidad de analito en la muestra.

12. Un método para determinar en una muestra la presencia y/o cantidad de un analito, comprendiendo el método:

25 (a) proporcionar en combinación en un medio:

(i) la muestra,

(ii) un miembro de un sistema productor de señal unido a un miembro de un par de unión específico que se une al analito o se une a un análogo de analito, y

(iii) una composición que comprende:

30 una partícula paramagnética que comprende:

(A) un miembro del par de unión específico que se une al analito o a un miembro sbp que se une al analito para formar un complejo relacionado con la presencia del analito, y

(B) un recubrimiento de un copolímero sintético de acuerdo con la reivindicación 1;

(b) someter la combinación a condiciones para formar el complejo;

35 (c) separar magnéticamente la partícula paramagnética del medio; y

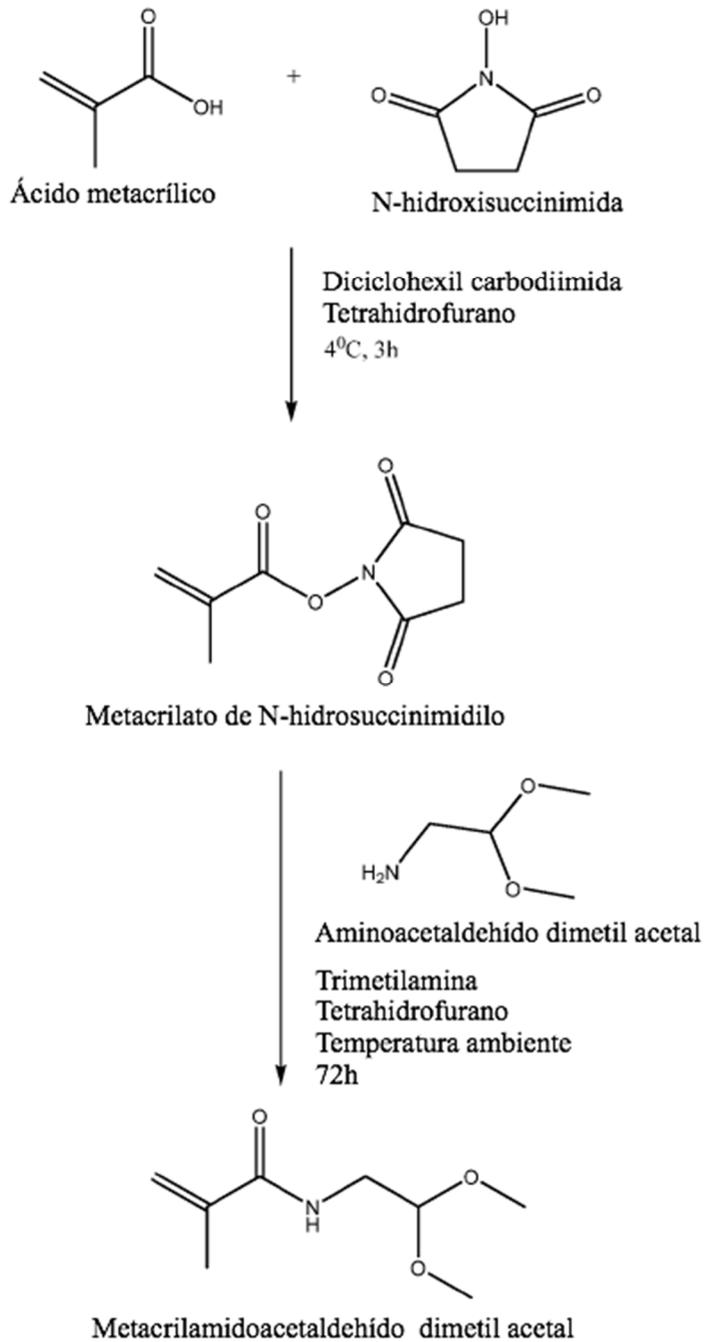
(d) activar el miembro del sistema productor de señal en la partícula paramagnética y detectar la cantidad del complejo, estando relacionada la cantidad del complejo con la presencia y/o cantidad de analito en la muestra.

40 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el miembro del sistema productor de señal se selecciona del grupo que consiste en compuestos quimioluminiscentes, compuestos fluorescentes, sensibilizadores, compuestos fosforescentes, colorantes y enzimas, o en donde el miembro del sistema productor de señal es un éster de acridinio.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la partícula es una partícula de óxido metálico en donde el metal es un metal paramagnético seleccionado del grupo que consiste en hierro, litio, sodio, magnesio, aluminio, manganeso, estroncio, zirconio, molibdeno, rutenio, rodio, paladio, estaño, samario, europio, tungsteno y platino.

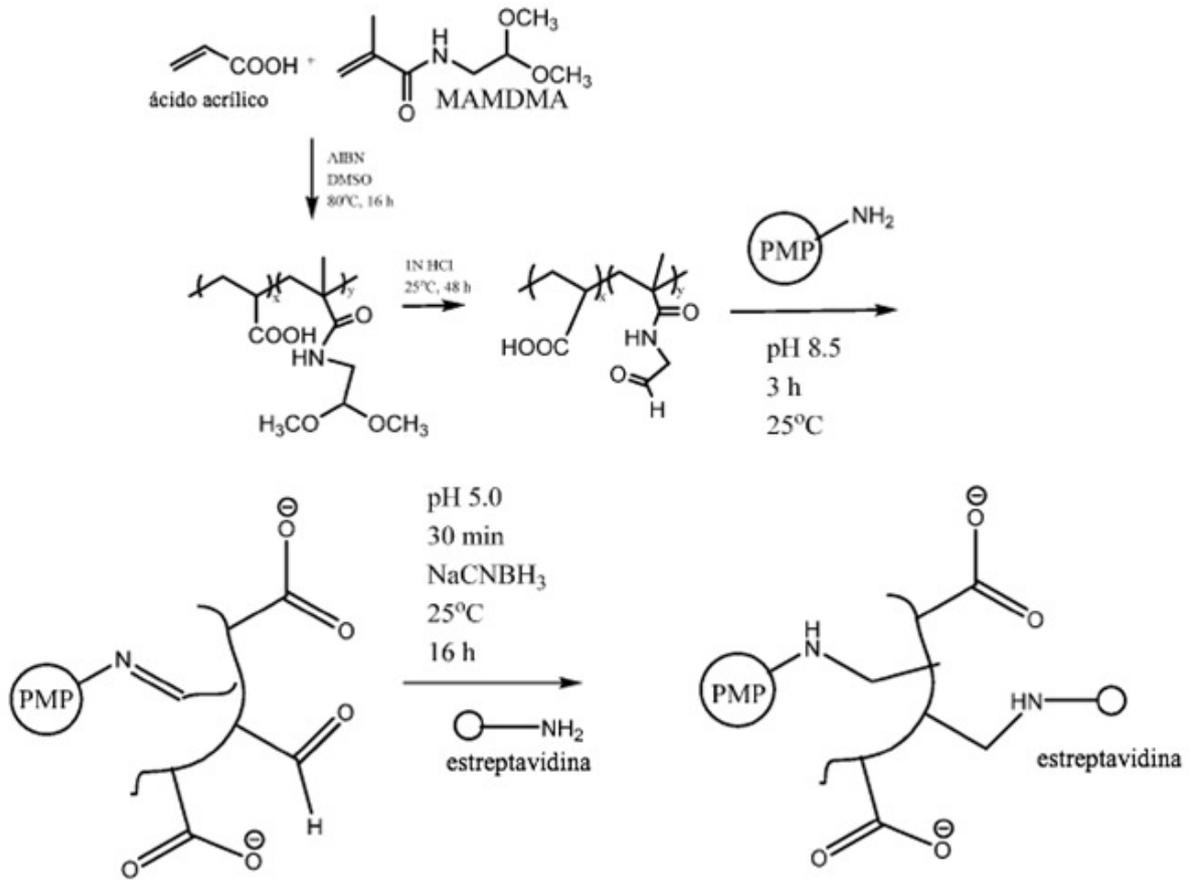
45 15. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el copolímero sintético comprende el copolímero de las reivindicaciones 2, 3, 4 o 5.

**Síntesis de MAMDMA**



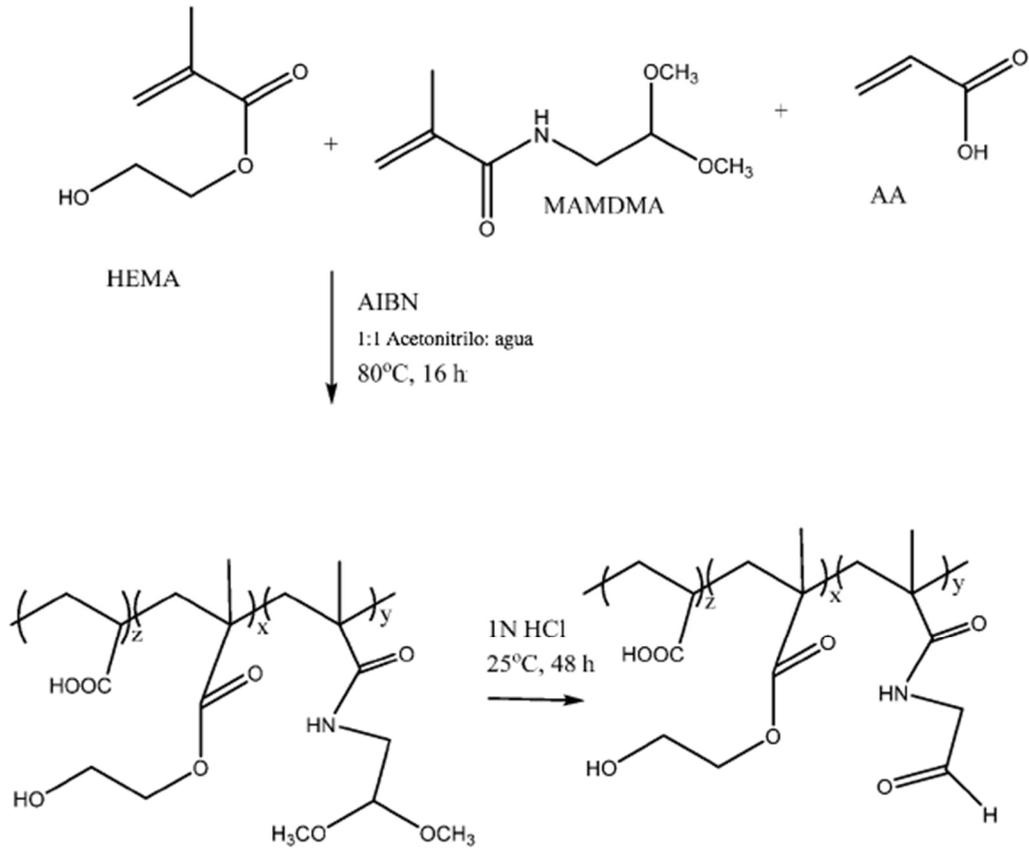
**FIGURA 1**

**Preparación de partícula paramagnética recubierta con poli(ácido acrílico-co-MA-Actl)-estreptavidina**



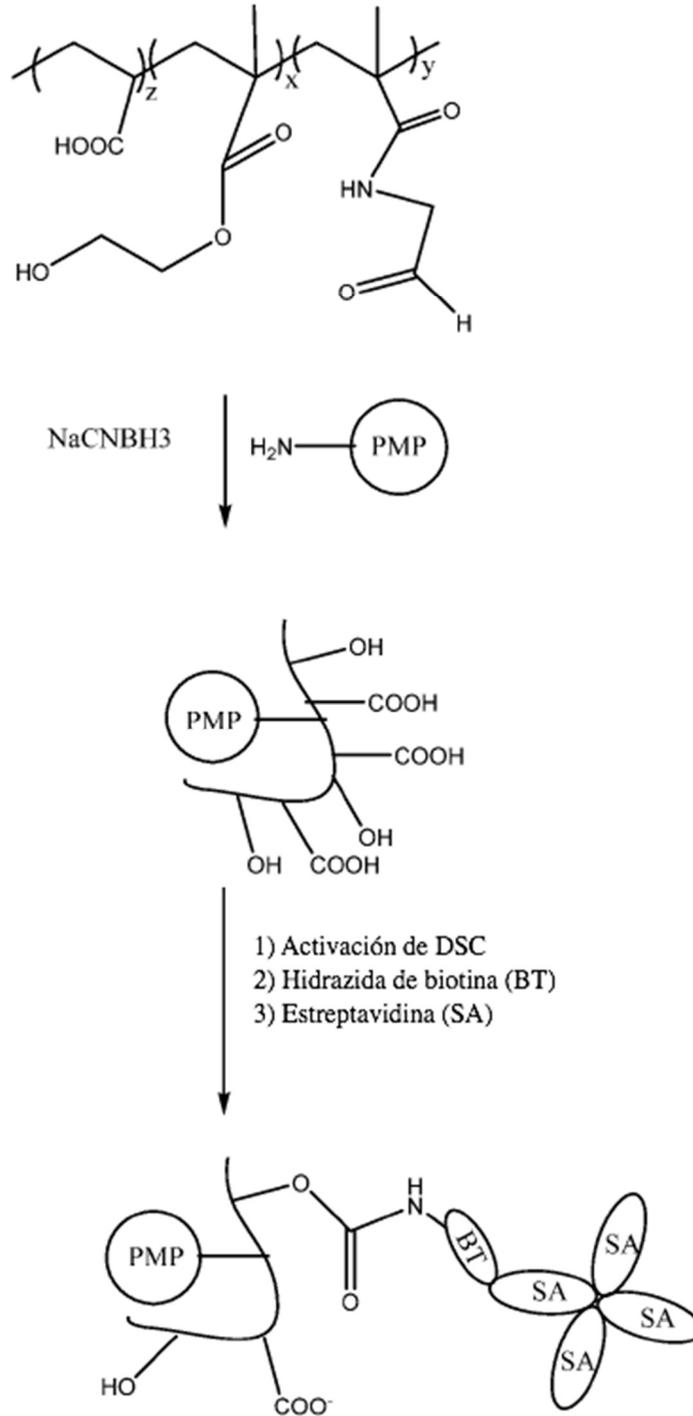
**FIGURA 2**

**Preparación de un copolímero con tres monómeros copolimerizados**



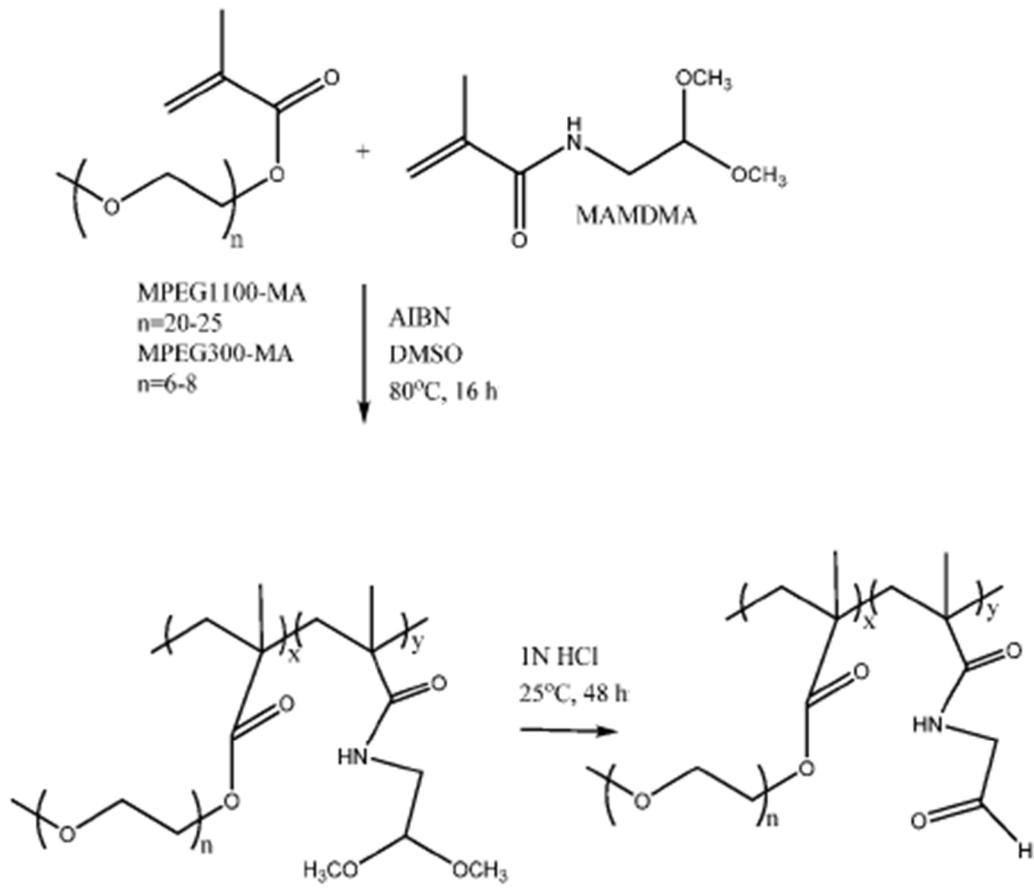
**FIGURA 3**

**Preparación de PMP recubierto con poli(HEMA-co-AA-co-MA-Actl)-estreptavidina (SA).**



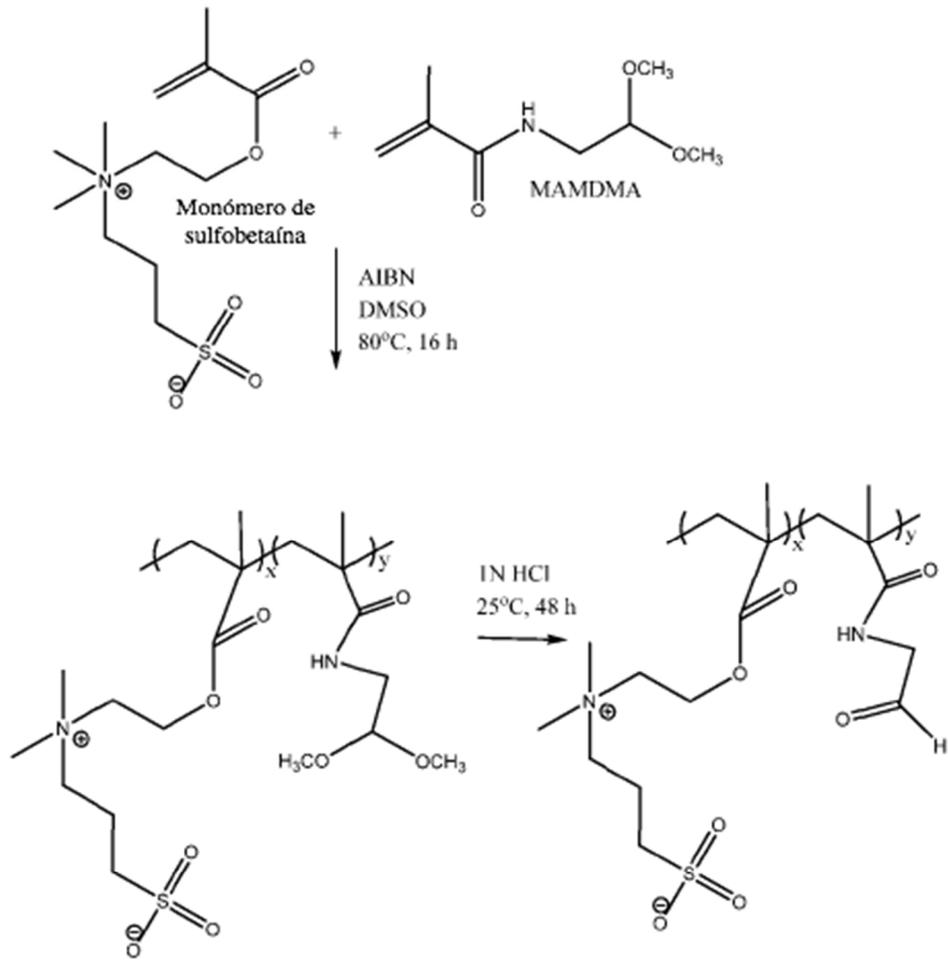
**FIGURA 4**

**Preparación de poli(MPEG1100-MA-co-MA-Actl) y  
poli(MPEG300-MA-co-MA-Actl)**

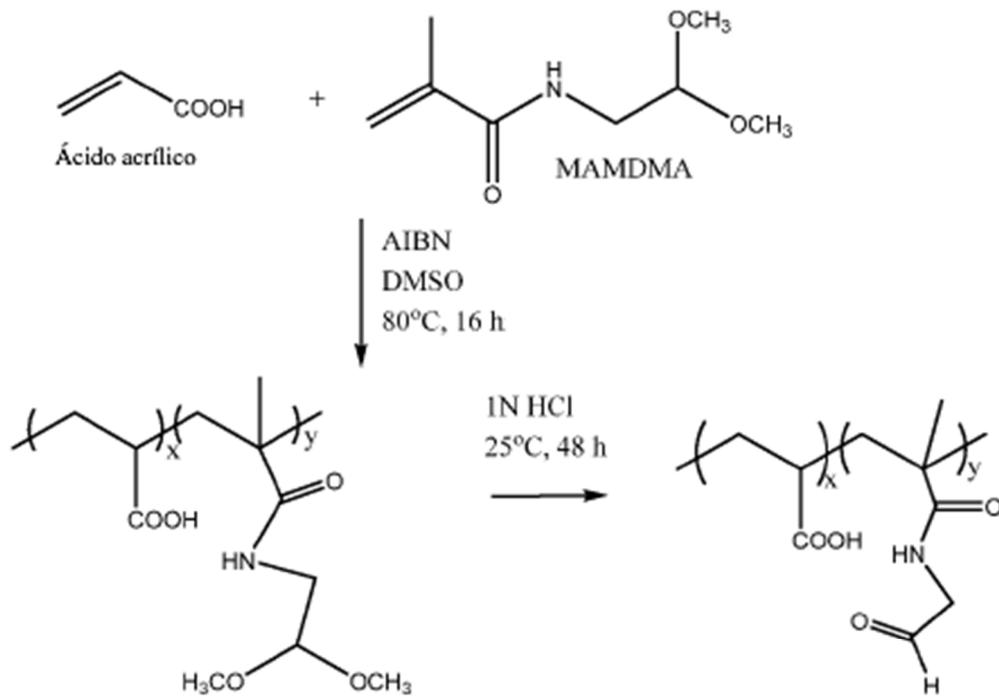


**FIGURA 5**

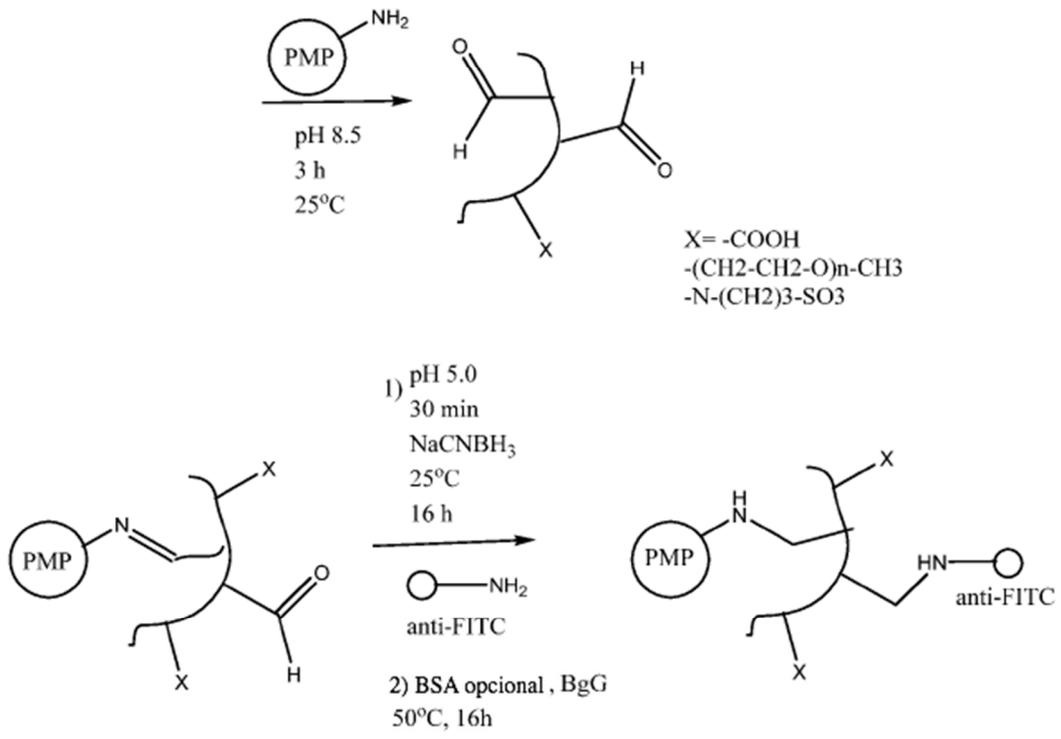
**Preparación de poli(sulfobetaina-MA-co-MA-ActI)**



**FIGURA 6**

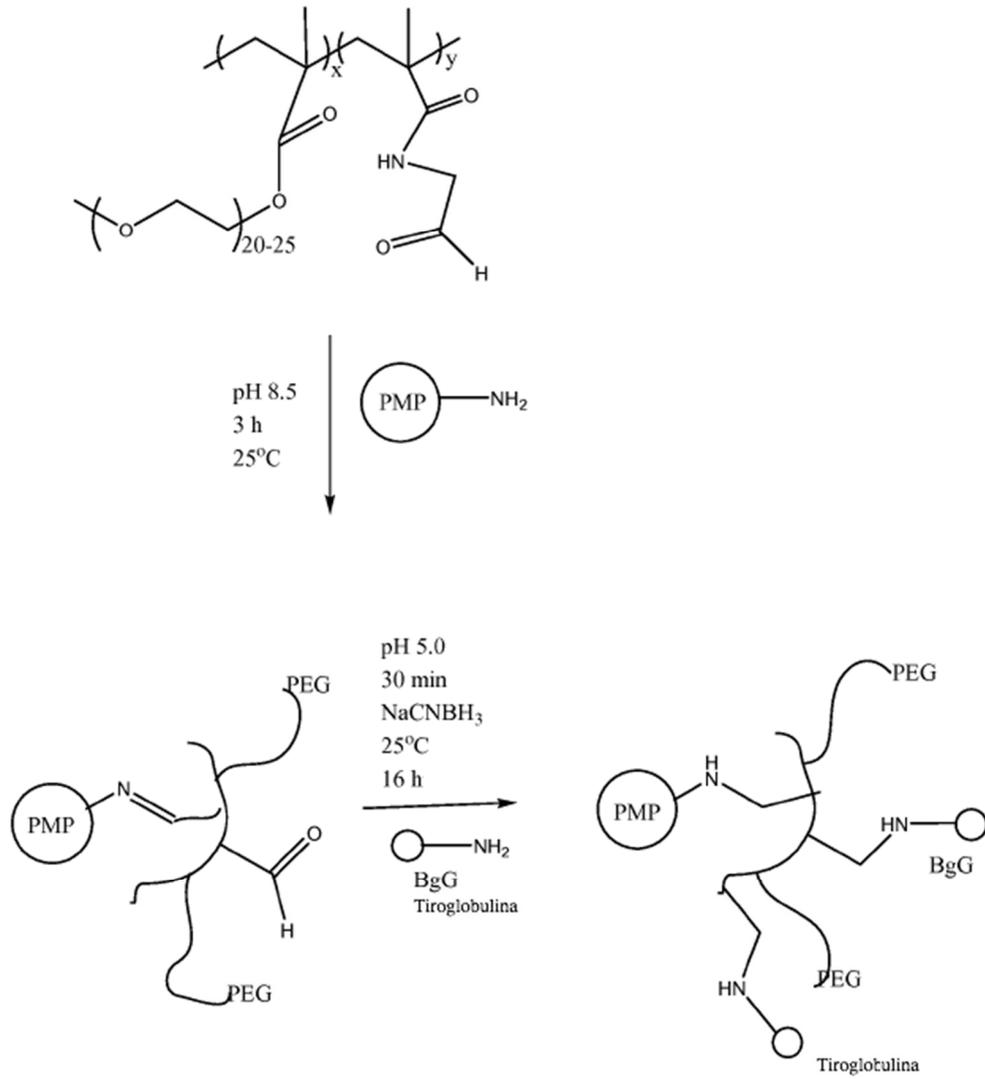
**Preparación de poli(AA-co-MA-ActI)****FIGURA 7**

**Preparación de conjugados PMP-anti FITC recubiertos con copolímero**



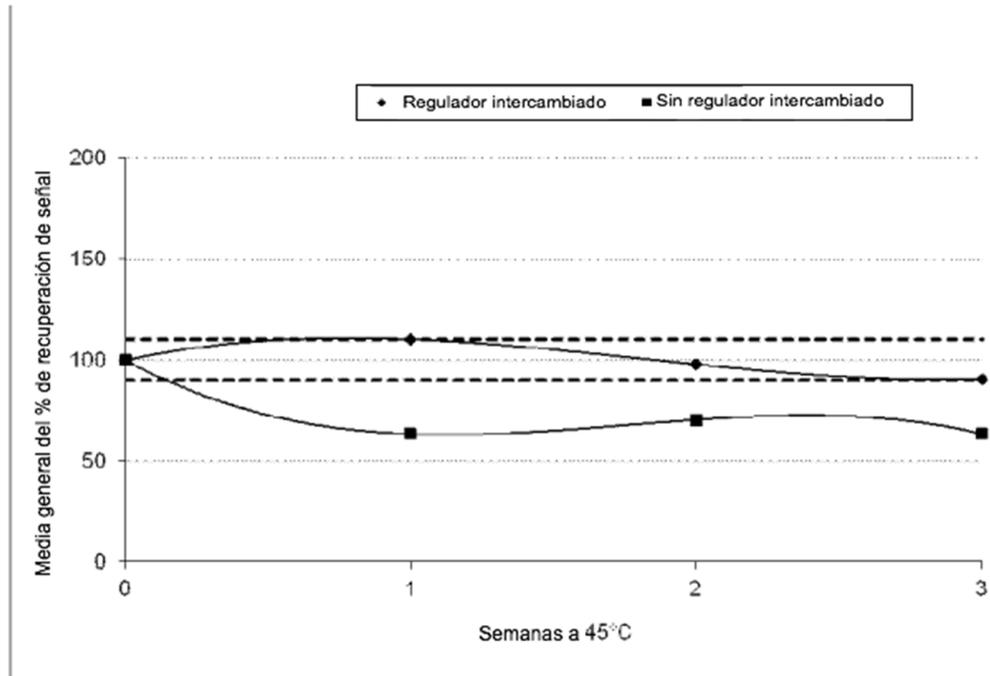
**FIGURA 8**

**Preparación de PMP recubierto con copolímero con BgG y TG unidos al mismo**



**FIGURA 9**

**Resultados del estudio de estabilidad de PMP-poli(HEMA-co-AA-co-MA-Actl)-Biotina-  
Estreptavidina**



**FIGURA 10**