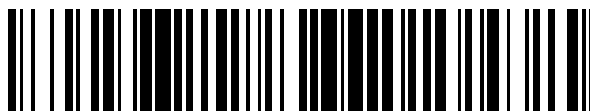


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 899**

51 Int. Cl.:

G01N 33/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2014 PCT/US2014/032967**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14168826**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2014 E 14782156 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2984489**

54 Título: **Ensayos para homólogos de analito**

30 Prioridad:

12.04.2013 US 201313861422

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

29.06.2020

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.

(100.0%)

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

72 Inventor/es:

**WEI, TIE Q.;
BEDZYK, WILLIAM y
GARCIA, ELSA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 769 899 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayos para homólogos de analito

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud no provisional de n.º de serie de EE. UU. 13/861.422, presentada el 12 de abril de 2013.

5 Antecedentes

La presente invención se refiere a composiciones, métodos y kits para determinar con precisión la cantidad total de homólogos de analito de una muestra sospechosa de contener los homólogos de analito.

10 Muchos compuestos de moléculas pequeñas o haptenos tales como, por ejemplo, fármacos y vitaminas, existen en formas homólogas, cada una de las cuales contribuye a la función biológica general del compuesto, ya sea directamente o mediante la intermediación de uno o más de sus productos metabólicos. Para obtener una medición precisa de la cantidad total de analito activo, es importante medir las cantidades esencialmente equimolares de las formas homólogas, porque, cuando las cantidades de las formas homólogas son desiguales, la señal obtenida en un ensayo está distorsionada y no representa la cantidad total de las formas homólogas. Algunos de los problemas relacionados con la medición de cantidades esencialmente equimolares de homólogos de analito incluyen, por
15 ejemplo, la dificultad de obtener un anticuerpo que se una por igual a los homólogos de analito y la liberación desigual de los homólogos de analito que están unidos por sustancias de unión endógenas.

Existe la necesidad de reactivos y métodos para determinar con precisión y sensibilidad las cantidades totales de un analito que existe en formas homólogas, siendo todas ellas activas, de muestras sospechosas de contener dichos analitos. Por ejemplo, existe la necesidad de reactivos y métodos para determinar con precisión y sensibilidad las
20 concentraciones de formas homólogas de vitamina D.

Sumario

En el presente documento se describen métodos para ajustar una contribución de uno de los dos homólogos de analito a una cantidad de señal obtenida en un ensayo para determinar una cantidad total de los dos homólogos de analito de una muestra. En el método, se proporciona una combinación en un medio de ensayo. La combinación comprende una
25 muestra sospechosa de contener los dos homólogos de analito, reactivos para realizar un ensayo de determinación de la cantidad total de los dos homólogos de analito en la muestra, en donde los reactivos comprenden al menos un receptor de ensayo que se une a los dos homólogos de analito, y un receptor que no es de ensayo que tiene una mayor afinidad de unión por cualquiera de los dos homólogos de analito cuya contribución a la cantidad de señal debe ajustarse. Una cantidad del receptor que no es de ensayo es suficiente para lograr un ajuste de la contribución del
30 homólogo de analito a la señal. Se realiza el ensayo para determinar la cantidad total de los dos homólogos de analito.

Además, en el presente documento, se describen métodos para determinar en una muestra una cantidad de un primer homólogo de analito y un segundo homólogo de analito. En el método, se proporciona una combinación en un medio de ensayo. La combinación comprende una muestra sospechosa de contener el primer homólogo de analito y el
35 segundo homólogo de analito, reactivos para realizar un ensayo para el primer homólogo de analito y el segundo homólogo de analito, y un receptor que no es de ensayo que tiene una mayor afinidad de unión por el primer homólogo de analito o el segundo homólogo de analito cuya contribución a la cantidad de señal debe ajustarse. Los reactivos para realizar un ensayo comprenden un anticuerpo de ensayo capaz de unirse a cada uno de entre el primer homólogo de analito y el segundo homólogo de analito para formar complejos y un elemento de un sistema de producción de señal que produce una señal en relación con la cantidad del primer homólogo de analito y el segundo homólogo de analito en los complejos. Una cantidad del receptor que no es de ensayo es suficiente para lograr un ajuste de la contribución del primer homólogo de analito o el segundo homólogo de analito a la señal. El medio de ensayo se incubaba en condiciones de formación de los complejos. Se determina una cantidad de señal de los complejos y se relaciona con la cantidad total del primer homólogo de analito y el segundo homólogo de analito de la muestra.

45 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento se dirigen a métodos para determinar, en una muestra, una cantidad total de 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃ de acuerdo con la reivindicación 1. Se proporciona una combinación en un medio de ensayo. La combinación comprende una muestra sospechosa de contener 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃, reactivos para realizar un ensayo para determinar la 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃, y un anticuerpo que no es de ensayo que tiene una mayor
50 afinidad de unión por la 25-hidroxitamina D₂. Los reactivos para realizar el ensayo comprenden un anticuerpo de ensayo capaz de unirse a 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃ para formar complejos y un elemento de un sistema de producción de señal que produce una señal en relación con la cantidad de complejos de 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃. Una cantidad del anticuerpo que no es de ensayo es suficiente para lograr un ajuste de la contribución de la 25-hidroxitamina D₂ a la cantidad de señal. El medio de ensayo se incubaba en condiciones de

formación de los complejos. Se determina la cantidad de señal de los complejos y se relaciona con la cantidad total de 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃ de la muestra.

Breve descripción de los dibujos

5 La Fig. 1 es una representación de las fórmulas químicas para las formas homólogas de vitamina D, en concreto, la 25-hidroxivitamina D₂ y la 25-hidroxivitamina D₃.

Descripción detallada de realizaciones específicas

Discusión general

10 En el presente documento, se describen métodos que están dirigidos a ajustar una contribución de dos o más homólogos de analito a una cantidad de señal obtenida en un ensayo para determinar una cantidad total de los homólogos de analito de una muestra. Hay una serie de razones por las que la contribución de un homólogo de analito a la señal obtenida en un ensayo puede dar lugar a una determinación inexacta de la cantidad total de homólogos de analito de una muestra. Estas razones incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo de ensayo que no se une por igual a los diferentes homólogos de analito presentes en una muestra y/o el hecho de que uno de los homólogos de analito puede ser desplazado de sustancias de unión endógenas por un agente de desplazamiento en una cantidad superior a la de otro homólogo de analito. Ambas situaciones anteriores dan lugar a la generación de cantidades desiguales de señal generadas, donde la contribución de uno de los homólogos de analito a la cantidad de señal hace que la cantidad de señal total refleje erróneamente la cantidad total de homólogos de analito de la muestra original. Por ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, hay dos factores potenciales que podrían contribuir a una mayor señal de ensayo para la 25-hidroxivitamina D₂. El primer factor es que la 25-hidroxivitamina D₂ se une a las proteínas de unión a la vitamina D con menor fuerza que la 25-hidroxivitamina D₃, por lo que la 25-hidroxivitamina D₂ se libera más fácilmente de las proteínas de unión a la vitamina D y proporciona una mayor concentración de moléculas de 25-hidroxivitamina D₂ que son accesibles por un anticuerpo de ensayo. El segundo factor es que, en algunos casos, el anticuerpo de ensayo tiene una mayor afinidad con el análogo de 25-hidroxivitamina D₂ que con 25-hidroxivitamina D₃. Los dos factores que funcionan juntos pueden dar lugar a una señal mucho mayor de la 25-hidroxivitamina D₂ que de la 25-hidroxivitamina D₃, lo que es la causa fundamental de la no equimolaridad.

15 El rendimiento de un formato de ensayo en particular en el extremo inferior de un intervalo de decisiones médicas se puede controlar mediante el control de una diferencia en la cantidad de señal obtenida para los calibradores que abarcan el intervalo de concentraciones sospechoso de interés de un analito. Se desea una gran diferencia o separación entre la señal para calibradores tales como, por ejemplo, el calibrador L1 y el calibrador L2 o el calibrador L2 y el calibrador L3, o el calibrador L1 y el calibrador L4, por ejemplo. En algunos ejemplos, se pueden emplear cinco calibradores, denominados arbitrariamente L1-L5. La relación de señal respecto a ruido puede evaluarse mediante la determinación de una cantidad de señal usando un calibrador que no contenga analito, denominado de manera arbitraria calibrador L1 (fondo), y la cantidad de señal obtenida para un calibrador que contenga una primera cantidad conocida de analito por encima de cero, denominado de manera arbitraria calibrador L2. Esta evaluación también puede incluir la determinación de una cantidad de señal usando el calibrador L1 y la cantidad de señal para un calibrador que contenga una segunda cantidad conocida de analito por encima de cero, denominado de manera arbitraria calibrador L3. Dicha evaluación también incluiría dicha determinación usando los calibradores L4 y L5, en donde cada uno de los calibradores contiene cantidades crecientes conocidas de analito. En función del formato de ensayo, la diferencia en la señal puede ser un aumento de señal o una disminución de señal. Por ejemplo, para un ensayo competitivo, en la mayoría de los casos, habrá una disminución en la señal en relación con la concentración de analito; y, para un ensayo de tipo sándwich, en la mayoría de los casos, habrá un aumento en la señal en relación con la concentración de analito.

20 Se representan las cantidades de señal obtenidas de los ensayos en los calibradores formados usando concentraciones conocidas del analito frente a la concentración de analito en cada calibrador para formar una curva de calibración o curva patrón. Se comparan los resultados obtenidos en los ensayos en muestras que contienen cantidades desconocidas de señal con la curva de calibración para determinar la cantidad de analito de la muestra desconocida en función de la cantidad de señal obtenida en un ensayo para el analito.

25 Los métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento miden cantidades totales de dos o más homólogos de analito donde los homólogos de analito o sus respectivos productos metabólicos son potentes. La expresión "homólogos de analito" o "formas homólogas de un analito" se refiere a las formas de un analito que están relacionadas por su estructura y función y que difieren entre sí por una o más fracciones químicas tales como, por ejemplo, grupos metileno, grupos metilo, hidrógenos, grupos ceto y epímeros, por ejemplo. El término "potente" se refiere al grado de actividad de un analito con respecto a una determinada función, que puede ser, por ejemplo, una función biológica tal como, por ejemplo, metabolismo óseo. Por ejemplo, la actividad biológica de una sustancia está relacionada con la capacidad de la sustancia para mejorar o suprimir una función biológica tal como, por ejemplo, el mantenimiento de niveles apropiados de minerales y sales en un sujeto, la función celular. La Vitamina D, a modo de

ilustración y no de limitación, mantiene los niveles apropiados de calcio y fosfato en un sujeto, lo que está relacionado con la homeostasis del calcio y el metabolismo óseo.

La evaluación precisa de la cantidad total de un analito que tiene dos o más formas homólogas en muestras biológicas es importante, particularmente cuando las dos o más formas homólogas son potentes. La presencia del analito puede ser indicativa de, por ejemplo, un estado patológico, una deficiencia, una mutación genética o un patrón metabólico relacionado con la farmacogenética. Por ejemplo, la medición de los niveles de vitamina D en muestras biológicas es importante, ya que la deficiencia de vitamina D está relacionada con una serie de trastornos en los mamíferos. En los niños menores de 7 años, por ejemplo, las mediciones de vitamina D que son inexactas conducen a una evaluación inexacta de los niveles de vitamina D en los niños menores de 7 años, que, a su vez, puede conducir a una falta de suplementación adecuada. Es importante medir la cantidad total de las formas activas de vitamina D para que un niño menor de 7 años pueda recibir el tratamiento adecuado con vitamina D, si es necesario.

El término "vitamina D" se refiere a un grupo de secosteroides liposolubles. En los seres humanos, la vitamina D es única, porque puede ingerirse como colecalciferol (vitamina D₃) o ergocalciferol (vitamina D₂) y porque el cuerpo también puede sintetizarla (a partir del colesterol) cuando la exposición al sol es adecuada. Debido a esta última propiedad, algunos consideran que la vitamina D es una vitamina dietética no esencial, aunque la mayoría la considera un nutriente esencial. La vitamina D tiene un importante papel fisiológico en la regulación positiva de la homeostasis del ion calcio. La vitamina D₃ es la forma de la vitamina sintetizada por los animales. También es un suplemento común añadido a los productos lácteos y a ciertos productos alimentarios como lo es la vitamina D₂. Las estructuras para la 25-hidroxivitamina D₃ y la 25-hidroxivitamina D₂ se exponen en la Fig. 1.

La vitamina D₃ y la vitamina D₂ tanto de la dieta como las sintetizadas intrínsecamente deben experimentar una activación metabólica para generar metabolitos bioactivos. En los seres humanos, la etapa inicial de la activación de la vitamina D₃ se produce principalmente en el hígado e implica la hidroxilación para formar el metabolito intermedio 25-hidroxicolecalciferol (también conocido como calcidiol, calcifediol, 25-hidroxicolecalciferol o 25-hidroxivitamina D₃). El calcidiol es la forma principal de vitamina D₃ en el sistema circulatorio. La vitamina D₂ también sufre una activación metabólica similar a la 25-hidroxivitamina D₂. En conjunto, estos compuestos se denominan 25-hidroxivitamina D (abreviadas como 25(OH)D), y son los principales metabolitos que se miden en el suero para determinar el estado de la vitamina D; Las 25(OH)D son prehormonas que necesitan convertirse en 1,25(OH)D para ejercer funciones biológicas.

Los métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento proporcionan el ajuste de una contribución de uno de los dos homólogos de analito a una cantidad de señal obtenida en un ensayo para determinar una cantidad total de los dos homólogos de analito en una muestra, particularmente cuando un receptor o miembro del par de unión específico tal como se emplea un anticuerpo que se une a todos los homólogos de analito en una muestra. En algunos ejemplos, es importante ajustar una cantidad de señal de un homólogo frente al otro homólogo para que la cantidad total de señal medida refleje cantidades esencialmente equimolares de los homólogos de analito de una muestra. Como se ha mencionado anteriormente, algunos de los problemas relacionados con la medición de cantidades esencialmente equimolares de homólogos de analito incluyen, por ejemplo, la dificultad de obtener un receptor, tal como un anticuerpo, que se una por igual a los homólogos de analito y la liberación desigual de homólogos de analito que están unidos por sustancias de unión endógenas. La expresión "cantidades esencialmente equimolares" significa que las cantidades de los homólogos de analito en el medio de ensayo son equivalentes o difieren en no más de, por ejemplo, el 10 %, o 9 %, o 8 %, o 7 %, o 6 %, o 5 %, o 4 %, o 3 %, o 2 %, o 1 %, o 0 % entre sí.

En el mejor de los casos, para un ensayo para dos o más homólogos de analito, se emplea un receptor, tal como un anticuerpo, que se une igualmente a los dos o más homólogos de analito. Sin embargo, en muchos casos, dicho receptor es difícil de obtener y debe usarse un receptor que se una de manera desigual a los dos o más homólogos de analito. En situaciones en las que se emplea un receptor que se une de manera desigual a los homólogos de analito, el ensayo puede producir un resultado inexacto para la concentración total de los homólogos de analito de una muestra. En dichas situaciones, los calibradores normalmente se forman usando solo uno de los homólogos de analito. Si un receptor usado en el ensayo se une más vigorosamente a uno de los homólogos de analito, se genera más señal a partir de ese homólogo de analito y se aumenta la cantidad total de señal. Cuando esta cantidad total de señal se compara con la curva de calibración, la cantidad total correspondiente de homólogos de analito obtenidos de la curva de calibración será superior a la cantidad total real de homólogos de analito de una muestra. Los métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento proporcionan medios para ajustar la cantidad de señal obtenida de modo que la señal pueda relacionarse con precisión con la cantidad total real de los homólogos de analito de una muestra.

Como se ha mencionado anteriormente, otra razón de la obtención de una señal inexacta en un ensayo para homólogos de analito es la liberación desigual de homólogos de analito que están unidos por sustancias de unión endógenas. Muchos homólogos de analito están unidos por sustancias de unión endógenas. Dichas sustancias de unión endógenas son aquellas que están presentes en una muestra tomada de su fuente. La naturaleza de las sustancias de unión endógenas depende de una o más de entre la naturaleza de la muestra, la naturaleza de la fuente de la muestra, la naturaleza del analito y la naturaleza de un complejo molecular que comprende el analito, por ejemplo.

Los homólogos de analito unidos por sustancias de unión endógenas pueden liberarse de dichas sustancias mediante un agente de desplazamiento como se ha descrito en el presente documento. Las sustancias de unión endógenas incluyen tanto sustancias de unión específica endógenas como sustancias de unión no específica endógenas. Las sustancias de unión específica son sustancias que tienen un área en una superficie o en una cavidad, que se une específicamente y, por lo tanto, se define como complementaria con, una organización espacial y polar determinada de un analito o viceversa. La unión específica se distingue de la unión no específica en que la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes entre sí en comparación con un reconocimiento esencialmente menor de otras moléculas. Las sustancias de unión no específica son sustancias que se unen a un analito, en general, mediante la unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de estructuras superficiales específicas. Las sustancias de unión endógenas para un analito incluyen, pero sin limitación, proteínas que se unen específicamente a un analito tales como, por ejemplo, Anticuerpos anti-analito y receptores, y proteínas de unión que se unen de forma no específica a un analito. En un ejemplo particular, a modo de ilustración y no de limitación, el analito es vitamina D y las sustancias de unión endógenas son proteínas de unión a la vitamina D.

En los casos que implican sustancias de unión endógenas, se puede emplear un agente de desplazamiento para liberar el analito de las sustancias de unión endógenas. Un problema con el uso de agentes de desplazamiento es que, en muchos casos, el agente de desplazamiento no desplaza a los homólogos de analito en cantidades iguales de las sustancias de unión endógenas. Más bien, un homólogo de analito puede desplazarse en mayores cantidades en relación con el desplazamiento de otro homólogo de ese mismo analito. Este fenómeno contribuye al problema de no tener cantidades esencialmente equimolares de señal obtenidas en un ensayo, incluso cuando un receptor para los homólogos de analito empleados en el ensayo se une esencialmente por igual a los homólogos de analito para la detección en un ensayo. Los métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento proporcionan medios para ajustar la cantidad de señal obtenida de modo que la señal pueda relacionarse con precisión con la cantidad total real de los homólogos de analito de una muestra.

Como se ha mencionado anteriormente, las mediciones de los homólogos de analito pueden realizarse en muestras que han sido tratadas con un agente de desplazamiento. La cantidad de agente de desplazamiento que se añade a la muestra es suficiente para desplazar esencialmente a todos los homólogos de analito de las sustancias de unión endógenas. La expresión "desplazan esencialmente a todos los homólogos de analito de las sustancias de unión endógenas" significa que los homólogos de analito son al menos el 80 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %, o al menos 99 %, o al menos 99,5 %, o al menos 99,9 % o el 100 % desplazados de las sustancias de unión endógenas y disponibles para la detección durante un ensayo.

Tras la adición de un agente de desplazamiento, la muestra se incuba durante un período de tiempo en condiciones para desplazar esencialmente todos los homólogos de analito de sustancias de unión endógenas. La duración y las condiciones de la incubación dependen de uno o más de entre la naturaleza del agente de desplazamiento, la naturaleza de los homólogos de analito y la concentración que se sospecha que hay de los homólogos de analito, por ejemplo. En algunas realizaciones, las temperaturas de incubación para esta etapa pueden ser de 5 °C a 99 °C, o de 15 °C a 70 °C, o de 20 °C a 45 °C, por ejemplo. El período de tiempo para la incubación es de 0,2 segundos a 24 horas, o de 1 segundo a 6 horas, o de 2 segundos a 1 hora, o de 1 a 15 minutos, por ejemplo. La incubación puede llevarse a cabo en un medio que, por comodidad, puede ser un medio de ensayo como el descrito en el presente documento, pero no es necesario.

En los métodos de ensayo de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, se proporciona una combinación en un medio de ensayo. La combinación comprende una muestra sospechosa de contener dos homólogos de analito, reactivos para realizar un ensayo de determinación de la cantidad total de los dos homólogos de analito en la muestra, en donde los reactivos comprenden al menos un receptor de ensayo que se une a los dos homólogos de analito, y un receptor que no es de ensayo que tiene una mayor afinidad de unión por cualquiera de los dos homólogos de analito cuya contribución a la cantidad de señal debe ajustarse. Una cantidad del receptor que no es de ensayo es suficiente para lograr una cantidad predeterminada de un ajuste de la contribución del homólogo de analito a la señal. Se realiza el ensayo para determinar la cantidad total de los dos homólogos de analito.

El receptor que no es de ensayo es una sustancia que se une preferentemente a un homólogo de analito frente a otro homólogo de analito y que no participa en la formación de un complejo relacionado con la presencia o la cantidad de los homólogos de analito de una muestra. El receptor que no es de ensayo puede ser, a modo de ilustración y no de limitación, un anticuerpo, un polímero de impresión molecular, ARN no codificante o ADN no codificante, por ejemplo.

El anticuerpo de ensayo presenta suficiente afinidad de unión de ensayo con los homólogos de analito sospechosos de estar en la muestra. El anticuerpo que no es de ensayo se une al homólogo de analito en exceso con una afinidad de unión que es superior a la afinidad de unión por el homólogo de analito que no está en exceso. En algunos ejemplos, el anticuerpo que no es de ensayo presenta suficiente afinidad de unión por el homólogo de analito en exceso, pero presenta una afinidad de unión insuficiente o esencialmente ninguna afinidad de unión por el homólogo de analito que no está en exceso.

La expresión "afinidad de unión de ensayo" se refiere a la fuerza con la que un anticuerpo de ensayo se une a los

homólogos de analito correspondientes para producir un complejo de anticuerpo de ensayo unido a los homólogos de analito. Un anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmentos de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de la misma pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab' y similares. Además, los agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos pueden usarse cuando sea necesario, siempre y cuando se mantenga la afinidad de enlace para una molécula en particular.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica, tales como la preparación de estirpes celulares híbridas continuas y la extracción de la proteína secretada (técnicas de hibridación de células somáticas). Los anticuerpos monoclonales pueden producirse de acuerdo con las técnicas convencionales de Köhler y Milstein, *Nature* 265:495-497, 1975. Se encuentran revisiones de las técnicas de anticuerpos monoclonales en "Lymphocyte Hybridomas", ed. Melchers, *et al.* Springer-Verlag (Nueva York 1978), *Nature* 266: 495 (1977), *Science* 208: 692 (1980) y *Methods of Enzymology* 73 (Parte B): 3-46 (1981).

En otro enfoque para la preparación de anticuerpos, la secuencia que codifica los sitios de unión del anticuerpo puede escindirse del ADN cromosómico e insertarse en un vector de clonación, el cual puede expresarse en bacterias para producir proteínas recombinantes que tengan los sitios de unión del anticuerpo correspondientes. Este enfoque implica clonar y expresar secuencias de nucleótidos, o versiones mutagenizadas de las mismas, que codifican al menos las secuencias de aminoácidos necesarias para la unión específica de anticuerpos naturales.

En un enfoque para la producción de anticuerpos monoclonales, una primera etapa incluye la inmunización de un animal productor de anticuerpos, tal como un ratón, una rata, una cabra, una oveja o una vaca con el antígeno, por ejemplo, con un inmunógeno. La inmunización se puede realizar con o sin un adyuvante tal como el adyuvante de Freund completo, u otros adyuvantes tales como monofosforil lípido A y el adyuvante de dicorinomicolato de trehalosa sintético. Una siguiente etapa incluye aislar células de bazo del animal productor de anticuerpos y fusionar las células del bazo productoras de anticuerpos con un compañero de fusión apropiado, normalmente una célula de mieloma, tal como mediante el uso de polietilenglicol u otras técnicas. Por lo general, las células de mieloma usadas son las que crecen normalmente en medio de hipoxantina-timidina (HT), pero que no pueden crecer en medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), usado para la selección de las células fusionadas. Una siguiente etapa incluye la selección de las células fusionadas, normalmente mediante la selección en medio HAT. Una siguiente etapa incluye el cribado de los híbridos clonados para la producción de anticuerpos apropiados, usando inmunoensayos tales como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) u otros inmunoensayos apropiados para la selección.

Se puede seleccionar un anticuerpo de ensayo con la afinidad de unión necesaria hacia homólogos de analito como se establecido anteriormente mediante metodologías de cribado bien conocidas, que incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, ELISA, inmunotransferencias, análisis Western y resonancia de plasmón superficial, por ejemplo.

Como se ha mencionado anteriormente, la función del receptor que no es de ensayo es proporcionar el ajuste de una contribución de uno de los dos homólogos de analito a una cantidad de señal obtenida en un ensayo para determinar una cantidad total de los dos homólogos de analito en una muestra. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, el receptor que no es de ensayo proporciona cantidades esencialmente equimolares de señal en el ensayo. Los receptores que no son de ensayo, tales como los anticuerpos que no son de ensayo, se escogen con este fin. Por ejemplo, se selecciona un anticuerpo que no es de ensayo por su capacidad (su afinidad de unión) para unirse a un homólogo de analito frente a otro homólogo de analito. Un anticuerpo que no es de ensayo debe presentar una afinidad de unión preferencial por un homólogo de analito que se sabe que está en exceso en el medio de ensayo como se ha descrito anteriormente.

Por consiguiente, se prepara un anticuerpo que no es de ensayo y se selecciona por medio de un método de selección apropiado, de modo que el anticuerpo que no es de ensayo presenta suficiente afinidad de unión hacia un homólogo de analito frente a otro homólogo de analito, de modo que la señal obtenida en un ensayo para los homólogos de analito se ajusta para una o ambas de entre la desigualdad de la afinidad de unión de un receptor de ensayo para los homólogos de analito y la liberación desigual de uno de los homólogos de analito a partir de sustancias de unión endógenas. Para los fines de la presente descripción, un homólogo de analito para el que un receptor de ensayo tiene una mayor afinidad de unión o que se libera en mayores cantidades desde las sustancias de unión endógenas se denomina en el presente documento "homólogo de analito en exceso", y el otro homólogo de analito se denomina en el presente documento "homólogo de analito no en exceso".

En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, el receptor que no es de ensayo es un anticuerpo que no es de ensayo. Se puede seleccionar un anticuerpo que no es de ensayo con la afinidad de unión requerida por un homólogo de analito como se ha establecido anteriormente mediante metodologías de cribado bien conocidas, que incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, ELISA, inmunotransferencias, análisis Western y resonancia de plasmón superficial, por ejemplo.

La expresión "afinidad de unión preferencial" significa que la afinidad de unión del anticuerpo que no es de ensayo por

el homólogo de analito en exceso es superior a la afinidad de unión del anticuerpo que no es de ensayo por el homólogo de analito que no está en exceso. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, el anticuerpo que no es de ensayo tiene una afinidad de unión por el homólogo de analito en exceso que es superior a su afinidad de unión por el homólogo de analito no en exceso por un factor, por ejemplo, de 10, o 10^2 , o 10^3 , o 10^4 , o 10^5 . Por ejemplo, si la afinidad de unión del anticuerpo que no es de ensayo por el homólogo de analito en exceso es de 10^9 litros/mol, la afinidad de unión del anticuerpo que no es de ensayo por el homólogo de analito no en exceso puede ser inferior a 10^7 litros/mol, o inferior a 10^6 litros/mol, por ejemplo. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, el anticuerpo que no es de ensayo no muestra esencialmente ninguna afinidad de unión por el homólogo de analito no en exceso. La expresión "no muestra esencialmente ninguna afinidad de unión" significa que esencialmente no se forman complejos detectables entre el anticuerpo que no es de ensayo y el homólogo de analito no en exceso.

En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, la afinidad de unión del anticuerpo que no es de ensayo por el homólogo de analito en exceso es de al menos 10^7 litros/mol, o al menos 10^8 litros/mol, o al menos 10^9 litros/mol, o al menos 10^{10} litros/mol, o al menos 10^{11} litros/mol, o al menos 10^{12} litros/mol, o al menos 10^{13} litros/mol, o al menos 10^{14} litros/mol, por ejemplo. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, la afinidad de unión del anticuerpo que no es de ensayo por el homólogo de analito en exceso es de 10^7 a 10^{14} litros/mol, o de 10^7 a 10^{11} litros/mol, o de 10^7 a 10^{12} litros/mol, o de 10^8 a 10^{14} litros/mol, o de 10^8 a 10^{11} litros/mol, o 10^8 a 10^{12} litros/mol, por ejemplo.

En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, la afinidad de unión del anticuerpo que no es de ensayo para el homólogo de analito no en exceso es inferior a 10^7 litros/mol, o inferior a 10^6 litros/mol, o inferior a 10^5 litros/mol, o inferior a 10^4 litros/mol, o inferior de 10^3 litros/mol, o menos de 10^2 litros/mol, o menos de 10 litros/mol, por ejemplo. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, la afinidad de unión del anticuerpo que no es de ensayo por el homólogo de analito no en exceso es de 10 a 10^6 litros/mol, o de 10 a 10^5 litros/mol, o de 10 a 10^4 litros/mol, o de 10 a 10^3 litros/mol, o 10 a 10^2 litros/mol, o 10^2 a 10^6 litros/mol, por ejemplo.

Una cantidad del receptor que no es de ensayo empleado es suficiente para lograr un ajuste de la contribución del homólogo de analito en exceso a la señal obtenida en un ensayo para la cantidad total de los homólogos de analito. En algunos ejemplos, una cantidad del receptor que no es de ensayo en el medio de ensayo es aquella suficiente para lograr cantidades de señal esencialmente iguales para el homólogo de analito en exceso y el homólogo de analito no en exceso en el medio de ensayo. La cantidad del receptor que no es de ensayo depende de diversos factores que incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, la naturaleza y la afinidad de unión del receptor que no es de ensayo por los diferentes homólogos de analito, la naturaleza y la afinidad de unión del receptor de ensayo por los diferentes homólogos de analito, la cantidad del homólogo de analito en exceso liberado por un agente de desplazamiento frente a la cantidad de homólogo de analito no en exceso liberado, la naturaleza de los homólogos de analito, la naturaleza del ensayo, la naturaleza de los reactivos de ensayo y la naturaleza de las muestras clínicas, por ejemplo. En algunos ejemplos, la cantidad del receptor que no es de ensayo empleado se determina empíricamente y se basa en uno o más de los factores anteriores. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, la cantidad del receptor que no es de ensayo es de 10 $\mu\text{g/ml}$ a 75 $\mu\text{g/ml}$, o de 10 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$, o de 10 $\mu\text{g/ml}$ a 25 $\mu\text{g/ml}$, por ejemplo.

El tratamiento del medio que comprende los homólogos de analito puede llevarse a cabo como una etapa separada o junto con un ensayo para los homólogos de analito. Cuando la cantidad del homólogo de analito en exceso se debe al tratamiento de la muestra con un agente de liberación como se ha descrito en el presente documento, el tratamiento del medio con un receptor que no es de ensayo se lleva a cabo después del tratamiento con un agente de liberación. Cuando la cantidad de homólogo de analito en exceso se debe a la desigualdad en la afinidad de unión del ensayo de un anticuerpo de ensayo por los homólogos de analito, el tratamiento del medio con un receptor que no es de ensayo se lleva a cabo durante el ensayo para los homólogos de analito.

Las condiciones de tratamiento del medio que comprende los homólogos de analito de acuerdo con los principios descritos en el presente documento pueden ser las mismas que las empleadas en un ensayo para los homólogos de analito. En algunos ejemplos, el tratamiento se lleva a cabo en un medio tamponado acuoso a un pH moderado, que, en general, proporciona una unión óptima del receptor que no es de ensayo al homólogo de analito en exceso. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir del 0,1 al 40 por ciento en volumen de un codisolvente. El pH para el medio estará en el intervalo de 4 a 11, o en el intervalo de 5 a 10, o en el intervalo de 6,5 a 9,5, por ejemplo. El pH normalmente será un compromiso entre el enlace óptimo de los elementos de enlace de cualquier par de enlace específico, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, tales como los elementos del sistema de producción de señal, y así sucesivamente. Se pueden usar diferentes tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el ensayo. Los tampones ilustrativos incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, borato, fosfato, carbonato, TRIS, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS y BICINA, por ejemplo. El tampón particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual se puede preferir un tampón u otro. Se pueden emplear diferentes materiales auxiliares en el tratamiento con un receptor que no es de ensayo. Por ejemplo, además de los tampones, el medio puede comprender estabilizantes para el medio y para los reactivos empleados.

Se pueden aplicar uno o más períodos de incubación al medio a uno o más intervalos que incluyen cualquier intervalo entre las adiciones de diferentes reactivos empleados en un tratamiento con un receptor que no es de ensayo. El medio se incuba normalmente a una temperatura y durante un tiempo suficientes para la unión de un receptor que no es de ensayo a un homólogo de analito en exceso. Habitualmente, se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y habitualmente una temperatura constante, preferentemente, temperatura ambiente, durante el período de la medición. En algunos ejemplos, las temperaturas de incubación varían de 5 °C a 99 °C, o de 15 °C a 70 °C, o de 20 °C a 45 °C, por ejemplo. El período de tiempo para la incubación, en algunos ejemplos, es de 0,2 segundos a 24 horas, o de 1 segundo a 6 horas, o de 2 segundos a 1 hora, o de 1 minuto a 15 minutos, por ejemplo. El período de tiempo depende de una serie de factores que incluyen, pero sin limitación, la temperatura del medio y la afinidad de unión del receptor que no es de ensayo para el homólogo de analito en exceso y para el homólogo de analito no en exceso, cuando sea adecuado, por ejemplo.

Luego se lleva a cabo un ensayo para el primer homólogo de analito y el segundo homólogo de analito para determinar una cantidad del primer homólogo de analito y el segundo homólogo de analito en una muestra. Los reactivos para realizar un ensayo comprenden un receptor de ensayo tal como, por ejemplo, un anticuerpo de ensayo capaz de unirse a cada uno de los homólogos de analito para formar complejos y un elemento de un sistema de producción de señal que produce una señal en relación con la cantidad de homólogos de analito en los complejos. Una cantidad del receptor que no es de ensayo es suficiente para lograr un ajuste de la contribución del primer homólogo de analito o el segundo homólogo de analito a la señal. El medio de ensayo se incuba en condiciones de formación de los complejos. Se determina una cantidad de señal de los complejos y se relaciona con la cantidad total de homólogos de analito de la muestra. El ensayo se puede seleccionar entre cualquier número de ensayos como se describe con más detalle a continuación.

Descripción general de los ensayos

La siguiente descripción es a modo de ilustración y no de limitación. Cualquier ensayo apropiado que utilice un anticuerpo (inmunoensayo) puede emplearse en las determinaciones implicadas de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. Los ensayos se pueden realizar sin la separación (homogéneos) o con la separación (heterogéneos) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los ensayos heterogéneos normalmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Los ensayos pueden ser manuales o automatizados.

La muestra que se va a analizar es aquella que se sospecha que contiene dos o más homólogos de analito. Las muestras pueden ser muestras biológicas o muestras no biológicas. Las muestras biológicas pueden ser de un sujeto mamífero o de un sujeto no mamífero. Los sujetos mamíferos pueden ser, por ejemplo, seres humanos u otras especies animales. Las muestras biológicas incluyen fluidos biológicos tales como sangre entera, suero, plasma, esputo, líquido linfático, semen, mucosidad vaginal, heces, orina, líquido espinal, saliva, deposición, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, mocos y similares; tejidos biológicos, tales como cabello, piel, secciones o tejidos extirpados de órganos u otras partes del cuerpo; y así sucesivamente. En muchos casos, la muestra es sangre entera, plasma o suero. Muestras no biológicas que incluyen, pero sin limitación, corrientes residuales, por ejemplo, también se puede analizar usando compuestos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento.

La muestra se puede preparar en cualquier medio conveniente, que puede ser, por ejemplo, un medio de ensayo, que se analiza más detalladamente a continuación. En algunos casos, puede aplicarse un pretratamiento a la muestra, tal como, por ejemplo, para liberar los homólogos de analito de las sustancias de unión endógenas o para lisar las células sanguíneas. En algunos ejemplos, dicho pretratamiento se realiza en un medio que no interfiere posteriormente con un ensayo.

En muchas realizaciones, los inmunoensayos implican reactivos marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos marcados incluyen inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayos, ensayo de inhibición, ensayos de luminiscencia inducida y ensayos de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo.

Un grupo general de inmunoensayos incluye inmunoensayos que usan 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. Otro grupo de inmunoensayos son los ensayos homogéneos sin separación en los que los reactivos marcados modulan la señal del marcador tras la unión de un anticuerpo de ensayo a los homólogos de analito de la muestra.

Como se ha mencionado anteriormente, los ensayos se pueden realizar sin la separación (homogéneos) o con la separación (heterogéneos) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ilustran con el ensayo EMIT® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL) descrito en Rubenstein, *et al.*, patente de EE.UU. n.º 3.817.837, de la columna 3, línea 6, a la columna 6, línea 64; el inmunoensayo de luminiscencia inducida ("tecnología LOCI®") desvelado en la patente de EE.UU. n.º 5.340.716 (Ullman, *et al.*); métodos de inmunofluorescencia tales como los desvelados en Ullman, *et al.*, patente de EE.UU. n.º 3.996.345, de la columna 17, línea 59, a la columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") tales como los

desvelados en Maggio, *et al.*, patente de EE.UU. n.º 4.233.402, de la columna 6, línea 25, a la columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") según lo desvelado, por ejemplo, en, entre otras, la patente de EE.UU. n.º 5.354.693; inmunoensayos enzimáticos tales como el ensayo de inmunosorción ligado a enzimas ("ELISA"). Son ejemplos de ensayos heterogéneos el radioinmunoensayo, desvelado en Yalow, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 39:1157 (1960).

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

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de colorante disperso ("DIA"); El met-aloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos de membrana enzimática ("EMIA"); luminoensayos ("LIA"); y así sucesivamente. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensores que implican el control de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de un reactivo tras la unión de un analito. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensor óptico, ensayos de inmunosensor acústico, ensayos de inmunosensor semiconductor, ensayos de inmunosensor transductor electroquímico, ensayos de inmunosensor potenciométrico y ensayos de electrodo amperométrico.

Los ensayos heterogéneos normalmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Se desvela una variedad de formatos de ensayo heterogéneos competitivos y no competitivos en Davalian, *et al.*, patente de los EE.UU. n.º 5.089.390, de la columna 14, línea 25, a la columna 15, línea 9. En un ejemplo de un ensayo heterogéneo competitivo, se pone en contacto un soporte que tiene un anticuerpo para el analito unido al mismo con un medio que contiene la muestra sospechosa de contener los homólogos de analito y un análogo de analito que comprende un marcador. Se incuban un anticuerpo que no es de ensayo de acuerdo con los principios descritos en el presente documento con la muestra bien antes o concomitantemente con el anticuerpo de ensayo sobre el soporte. Los homólogos de analito de la muestra compiten, para unirse al anticuerpo del analito, con el análogo de analito marcado. Tras la separación del soporte y del medio, se determina la actividad del marcador del soporte o del medio mediante técnicas convencionales y se relaciona con la cantidad de analito de la muestra. En una variación del ensayo heterogéneo competitivo anterior, el soporte comprende un análogo de analito, que compite con los homólogos de analito de la muestra para unirse a un reactivo de anticuerpo de ensayo de acuerdo con los principios descritos en el presente documento.

En algunos ejemplos, la muestra que se va a analizar se somete a un pretratamiento para liberar analito de las sustancias de unión endógenas tales como, por ejemplo, proteínas plasmáticas o séricas que se unen al analito. La liberación del analito de las sustancias de unión endógenas puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la adición de un agente de digestión o un agente de liberación, o una combinación de un agente de digestión y un agente de liberación usados secuencialmente. El agente de digestión es aquel que descompone las sustancias de unión endógenas para que ya no puedan unirse al analito. Dichos agentes incluyen, pero sin limitación, proteinasa K, y proteinasa K y agentes desnaturizantes de proteínas tales como, por ejemplo, detergentes (dodecilsulfato de sodio, por ejemplo). Los agentes de liberación para liberar el analito de las sustancias de unión endógenas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, agentes desnaturizantes ácidos tales como, por ejemplo, ácido salicílico, warfarina, ácidos sulfónicos, ácidos toluenosulfónicos, ácido naftalenosulfónico, ácidos anilinaftalenosulfónicos (ANS) (incluyendo, por ejemplo, ácido 1-anilinoftalen-8-sulfónico (1,8-ANS) y ácido 8-anilinoftalen-1-sulfónico (8-ANS)), ácidos salicílicos y derivados de los anteriores.

Las condiciones tales como, por ejemplo, la duración, la temperatura, el pH y la concentración del agente de liberación en el medio para llevar a cabo las acciones de digestión y/o liberación dependen de la naturaleza del analito, la naturaleza de las sustancias de unión endógenas, la naturaleza de la muestra y la naturaleza del agente de liberación, por ejemplo. En general, las condiciones son suficientes para lograr el efecto o la función deseados. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, una concentración eficaz de agente de liberación es de 0,01 a 20 mg/ml, o de 0,01 a 10 mg/ml, o de 0,01 a 5 mg/ml, o de 0,1 a 20 mg/ml, o de 0,1 a 10 mg/ml, o de 0,1 a 5 mg/ml, o de 0,1 a 1 mg/ml. El pretratamiento de la muestra para liberar el analito de las sustancias de unión endógenas se puede llevar a cabo como una etapa separada antes de realizar un ensayo o como una primera etapa de un ensayo. En cualquier caso, se pueden requerir uno o más reactivos para detener la acción del agente de digestión y/o el agente de liberación.

Las condiciones para realizar un ensayo en una muestra de acuerdo con los principios descritos en el presente documento incluyen llevar a cabo el ensayo en un medio tamponado acuoso a un pH moderado, que, en general, proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir del 0,1 al 40 por ciento en volumen de un codisolvente. El pH para el medio estará en el intervalo de 4 a 11, o en el intervalo de 5 a 10, o en el intervalo de 6,5 a 9,5, por ejemplo. El pH normalmente será un compromiso entre el enlace óptimo de los elementos de enlace de cualquier par de enlace específico, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, tales

como los elementos del sistema de producción de señal, y así sucesivamente. Se pueden usar diferentes tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el ensayo. Los tampones ilustrativos incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, borato, fosfato, carbonato, TRIS, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS y BICINA, por ejemplo. El tampón particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual se puede preferir un tampón u otro.

Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en los métodos de ensayo. Por ejemplo, además de los tampones, el medio puede comprender estabilizantes para el medio y para los reactivos empleados. En algunas realizaciones, además de estos aditivos, pueden incluirse 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 unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; polisacáridos tales como, por ejemplo, dextrano o trehalosa. El medio también puede comprender agentes para la prevención de la formación de coágulos sanguíneos. Dichos agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, EDTA, EGTA, citrato, heparina, por ejemplo. El medio también puede comprender uno o más conservantes tales como, pero sin limitación, azida de sodio, sulfato de neomicina, PROCLIN® 300, Estreptomina, por ejemplo. El medio puede comprender además uno o más tensioactivos. Cualquiera de los materiales anteriores, si se emplean, está presente a una concentración o en cantidad suficientes como para lograr el efecto o la función deseados.

Se pueden aplicar uno o más períodos de incubación al medio en uno o más intervalos que incluyen cualquier intervalo entre las adiciones de diferentes reactivos empleados en un ensayo, incluyendo los mencionados anteriormente. El medio normalmente se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficientes para que se produzca la unión de diferentes componentes de los reactivos y la unión del analito en la muestra, tales como, por ejemplo, la unión de un anticuerpo que no es de ensayo a un homólogo de analito o la unión de un anticuerpo de ensayo a homólogos de analito. Habitualmente, se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y habitualmente una temperatura constante, preferentemente, temperatura ambiente, durante el período de la medición. En algunos ejemplos, las temperaturas de incubación varían de 5 °C a 99 °C, o de 15 °C a 70 °C, o de 20 °C a 45 °C, por ejemplo. El período de tiempo para la incubación, en algunos ejemplos, es de 0,2 segundos a 24 horas, o de 1 segundo a 6 horas, o de 2 segundos a 1 hora, o de 1 minuto a 15 minutos, por ejemplo. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de unión de los distintos reactivos, que se determina mediante la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de velocidad de disociación.

Muchos ensayos analizados en el presente documento usan un sistema de producción de señal, que puede tener uno o más componentes, siendo al menos un componente un marcador. El sistema de producción de señal genera una señal que está relacionada con la presencia de homólogos de analito en una muestra. El sistema de producción de señal incluye todos los reactivos necesarios para producir una señal medible. Otros componentes del sistema de producción de señal pueden incluirse en una solución de desarrollo, y pueden incluir, pero sin limitación, sustratos, potenciadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos y sustancias de unión específicas requeridas para la unión de sustancias generadoras de señal, por ejemplo. Otros componentes del sistema de producción de señal pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, por ejemplo. El sistema de producción de señal proporciona una señal detectable por medios externos, mediante el uso de radiación electromagnética, deseablemente mediante un examen visual. Se describen ejemplos de sistemas de producción de señales en la patente de EE.UU. n.º. 5.508.178.

El término "marcador" incluye marcadores de poli(aminoácidos) y marcadores no de poli(aminoácidos). La expresión "fracciones de marcadores de poli(aminoácido)" incluye marcadores que son proteínas tales como, pero sin limitación, enzimas, anticuerpos, péptidos e inmunógenos, por ejemplo. Con proteínas marcadoras tales como, por ejemplo, enzimas, el intervalo de peso molecular será de 10.000 a 600.000, o de 10.000 a 300.000 de peso molecular. En general, hay al menos un compuesto de acuerdo con los principios descritos en el presente documento (grupo análogo) por 200.000 de peso molecular, o al menos 1 por 150.000 de peso molecular, o al menos 1 por 100.000 de peso molecular, o al menos 1 por 50.000 de peso molecular, por ejemplo, de la proteína. En el caso de las enzimas, el número de grupos análogos suele ser de 1 a 20, de 2 a 15, de 3 a 12 o de 6 a 10.

Las enzimas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, enzimas rédox tales como, por ejemplo, deshidrogenasas, por ejemplo, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa; enzimas que implican la producción de peróxido de hidrógeno y el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante en un colorante, tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa y microperoxidasa; hidrolasas tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina y β -galactosidasa; luciferasas tales como, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; transferasas; combinaciones de enzimas tales como, pero sin limitación, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasas, u oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasas, junto con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, es decir, una peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa o microperoxidasa, por ejemplo.

La expresión "marcadores no de poli(aminoácidos)" incluye aquellos marcadores que no son proteínas. El marcador no de poli(aminoácido) puede detectarse directamente o es detectable a través de una reacción que produce una señal detectable. El marcador no de poli(aminoácido) puede ser isotópico o no isotópico, y puede ser, a modo de

ilustración y no de limitación, un radioisótopo, un compuesto luminiscente (que incluye, pero sin limitación, compuestos fluorescentes y compuestos quimioluminiscentes, por ejemplo), un polinucleótido que codifica un catalizador, un promotor, un colorante, una coenzima, un sustrato enzimático, un grupo radiactivo y una secuencia polinucleotídica amplificable, por ejemplo.

5 En algunos ejemplos, un elemento del sistema de producción de señal es una pequeña molécula orgánica, que se refiere a una molécula de peso molecular de 200 a 2.000, o de 200 a 1.500, o de 200 a 1.000, o de 200 a 500. Dichas moléculas orgánicas pequeñas incluyen, pero sin limitación, biotina, moléculas fluorescentes (tales como fluoresceína y rodamina, por ejemplo), moléculas quimioluminiscentes y dinitrofenol, por ejemplo. Una pareja de unión para una molécula orgánica pequeña es una molécula que reconoce y se une específicamente a la molécula pequeña. Las parejas de unión para una molécula pequeña se definen por la naturaleza de la molécula pequeña e incluyen, pero sin limitación, avidina, estreptavidina, anticuerpo para la molécula orgánica pequeña (que incluye, pero sin limitación, anticuerpo para una molécula fluorescente (tal como anticuerpo para fluoresceína y anticuerpo para rodamina, por ejemplo), anticuerpo para una molécula quimioluminiscente, anticuerpo para dinitrofenol, por ejemplo.

15 En algunos ejemplos de ensayos, se utiliza un soporte. El soporte puede estar compuesto por un producto orgánico o inorgánico, sólido o fluido, material insoluble en agua y que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de diversas formas, tales como, pero sin limitación, una partícula (soporte de partículas) que incluye una perla, una película, una membrana, un tubo, un pocillo, una tira, una varilla, una fibra o una superficie plana tal como, por ejemplo, una placa o un papel, por ejemplo. El soporte puede o puede no suspenderse en el medio en el que se emplea. Los ejemplos de soportes que se pueden suspender son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, nanogotas de aceite, células e hidrogeles, y partículas magnéticas, por ejemplo. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como, a modo de ilustración y no de limitación, nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nylon, poli(butirato de vinilo), por ejemplo, ya sea usados por sí mismos o junto con otros materiales. El soporte puede o no estar marcado además con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, por ejemplo.

25 En algunos ejemplos, el soporte puede ser una partícula. Las partículas tienen un diámetro medio de al menos 0,02 micrómetros y no más de 100 micrómetros. En algunos ejemplos, las partículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 0,05 micrómetros a 20 micrómetros, o de 0,3 micrómetros a 10 micrómetros. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferentemente de una densidad que se aproxima al agua, en general, de 0,7 g/ml a 1,5 g/ml y puede estar compuesta de un material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos, tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, virus, por ejemplo. Las partículas también pueden ser partículas compuestas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, partículas magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones, lipoproteínas y similares. En algunos ejemplos, las partículas son partículas de dióxido de cromo (cromo) o partículas de látex.

30 Las partículas quimioluminiscentes son partículas que se han asociado con un compuesto quimioluminiscente. La expresión "asociado/a/s con", como se usa en el presente documento, significa que un compuesto tal como, por ejemplo, un compuesto quimioluminiscente y una partícula pueden estar asociados por enlaces directos o indirectos, adsorción, absorción, incorporación o solución, por ejemplo. Los ejemplos de compuestos quimioluminiscentes que se pueden utilizar son los establecidos en las patentes de EE.UU. n.º 5.340.716 y 6.251.581. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, el compuesto quimioluminiscente es una sustancia fotoactivable que sufre una reacción química tras la excitación directa o sensibilizada por la luz o tras la reacción con oxígeno singlete para formar un producto de reacción metaestable que sea capaz de descomponerse con la emisión simultánea o posterior de luz, normalmente dentro del intervalo de longitud de onda de 250 a 1.200 nm. El término "fotoactivable" incluye "fotoquímicamente activable". En algunos ejemplos, los compuestos quimioluminiscentes son aquellos que reaccionan con el oxígeno singlete para formar dioxetanos o dioxetanonas. Estas últimas normalmente son olefinas ricas en electrones. Los ejemplos de dichas olefinas ricas en electrones son los éteres de enol, enaminas, 9-alkiliden-N-alkilacridanos, arilviniléteres, di-oxenos, arilimidazoles, 9-alkiliden-xantanos y lucigenina. Otros compuestos incluyen luminol y otras ftalhidrazidas y compuestos quimioluminiscentes que están protegidos contra una reacción quimioluminiscente en virtud de estar protegidos por un grupo protector fotoquímicamente lábil, incluyendo dichos compuestos, por ejemplo, luciferina de luciérnaga, aquaforina y luminol. Los ejemplos de dichos compuestos quimioluminiscentes que se pueden utilizar son los establecidos en la patente de EE.UU. n.º 5.709.994.

55 Las partículas sensibilizadoras son partículas que se han asociado con un compuesto sensibilizador, que incluye, pero sin limitación, un compuesto fotosensibilizador. Los ejemplos de compuestos sensibilizadores que se pueden utilizar son los establecidos en las patentes de EE.UU. n.º 5.340.716 y 6.251.581.

Un fotosensibilizador es un sensibilizador para la generación de oxígeno singlete generalmente mediante la excitación con luz. En algunos ejemplos, el fotosensibilizador absorbe a una longitud de onda más larga que el compuesto quimioluminiscente y tiene un triplete de energía menor que el compuesto quimioluminiscente. El fotosensibilizador

puede ser fotoactivable (por ejemplo, colorantes y compuestos aromáticos). El fotosensibilizador normalmente es un compuesto que se compone de átomos unidos covalentemente, normalmente, con múltiples enlaces dobles o triples conjugados. El compuesto debe absorber la luz en el intervalo de longitud de onda de 200-1100 nm, normalmente de 300 a 1000 nm, preferentemente de 450 a 950 nm. Los fotosensibilizadores típicos incluyen, pero sin limitación, acetona, benzofenona, 9-tioxantona, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metaloporfirinas (por ejemplo, hematoporfirina), ftalocianinas, clorofilas, rosa de bengala, buckminsterfullereno, por ejemplo, y derivados de estos compuestos. Los ejemplos de otros fotosensibilizadores se enumeran en N. J. Turro, "Molecular Photochemistry", página 132, W. A. Benjamin Inc., N.Y. 1965. El fotosensibilizador ayuda a la fotoactivación donde la activación es mediante oxígeno singlete. Normalmente, el fotosensibilizador absorbe la luz y el fotosensibilizador excitado así formado activa el oxígeno para producir oxígeno singlete, que reacciona con el compuesto quimioluminiscente, dando un producto intermedio luminescente metaestable.

Algunos ensayos conocidos utilizan un sistema de producción de señal (sps) que emplea un primer y un segundo elemento de sps. Los elementos de sps pueden estar relacionados por que la activación de un elemento del sps produce un producto, tal como, por ejemplo, luz o un producto activado, que da como resultado una activación de otro elemento del sps.

En un ejemplo de dicho ensayo, los elementos de sps comprenden un sensibilizador tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador, y una composición quimioluminiscente que incluye un compuesto quimioluminiscente donde la activación del sensibilizador da lugar a un producto que activa la composición quimioluminiscente. El segundo elemento de sps normalmente genera una señal detectable que se refiere a la cantidad de elemento de sps enlazado y/o no enlazado, es decir, la cantidad de elemento de sps enlazado o no enlazado al analito que se detecta. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, uno de bien el reactivo sensibilizador o el reactivo quimioluminiscente comprende un reactivo de anticuerpo de acuerdo con los principios descritos en el presente documento.

La concentración de los homólogos de analito en una muestra que puede ensayarse, generalmente, varía de 10^{-5} a 10^{-17} M, o de 10^{-6} a 10^{-14} M, por ejemplo. Consideraciones tales como si el ensayo es cualitativo, semicualitativo o cuantitativo (con respecto a la cantidad del analito presente en la muestra), la técnica de detección en particular y la concentración esperada del analito, normalmente determinan las concentraciones de los diferentes reactivos.

Las concentraciones de los diferentes reactivos en el medio de ensayo, en general, estarán determinadas por el intervalo de concentraciones de interés de los homólogos de 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 intervalo de interés. Es decir, una variación en la concentración del analito que sea de importancia debe proporcionar una diferencia de señal medible de forma precisa. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema de producción de señal y la naturaleza de los homólogos de analito normalmente determinan las concentraciones de los diferentes reactivos.

Como se ha mencionado anteriormente, la muestra y los reactivos se proporcionan en combinación en el medio. Aunque el orden de adición al medio puede variar, existirán determinadas preferencias para algunas realizaciones de los formatos de ensayo descritos en el presente documento. El orden de adición más sencillo, por supuesto, es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que tiene el medio de ensayo sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Como alternativa, cada uno de los reactivos, o grupos de reactivos, puede combinarse secuencialmente. En algunas realizaciones, puede estar implicada una etapa de incubación después de cada adición, como se ha tratado anteriormente. En ensayos heterogéneos, las etapas de lavado también pueden emplearse después de una o más etapas de incubación.

Ejemplos específicos de métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento están dirigidos a determinar, en una muestra, una cantidad total de dos o más homólogos de analito en una muestra sospechosa de contener los homólogos de analito. Se mide una cantidad total de los homólogos de analito realizando un ensayo en una muestra con el uso de un receptor de ensayo tal como, por ejemplo, un anticuerpo de ensayo. Antes o simultáneamente con el mismo, la muestra se incuba con un anticuerpo que no es de ensayo como se ha analizado con más detalle anteriormente. En los ejemplos expuestos a continuación, tanto el anticuerpo de ensayo como el anticuerpo que no es de ensayo son anticuerpos monoclonales preparados y cribados mediante uno o más de los procedimientos descritos anteriormente.

En los siguientes ejemplos particulares, los homólogos de analito son vitamina D₂ y vitamina D₃ a modo de ilustración y no de limitación. Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento están dirigidos a métodos de determinación de una cantidad total de vitamina D₂ y vitamina D₃ en una muestra sospechosa de contener homólogos de vitamina D y pueden denominarse en el presente documento "ensayos de vitamina D". Como se usa en el presente documento en referencia a los ensayos específicos que se analizan a continuación, la expresión

"homólogo/s de vitamina D" se refiere a vitamina D₂ y vitamina D₃.

En un ejemplo, se puede emplear un inmunoensayo de luminiscencia inducida. El inmunoensayo de luminiscencia inducida se menciona en la patente de EE.UU. n.º 5.340.716 (Ullman). En un enfoque, el ensayo usa una partícula que se ha asociado con un fotosensibilizador donde un análogo de vitamina D está unido a la partícula (reactivo de partícula-análogo). El reactivo quimioluminiscente comprende un anticuerpo de ensayo que presenta suficiente afinidad de unión al ensayo para cada uno de los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃. En este ejemplo, el anticuerpo de ensayo presenta una afinidad de unión esencialmente equivalente por los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃. Sin embargo, la muestra se trata previamente con un agente de liberación y el homólogo de vitamina D₂ se libera de sustancias de unión endógenas en una cantidad superior a la del homólogo de vitamina D₃. En conformidad con los principios descritos en el presente documento, se incuban anticuerpos que no es de ensayo preparado como se ha descrito anteriormente con el medio que comprende los homólogos liberados. El anticuerpo que no es de ensayo presenta una afinidad de unión preferencial por el homólogo de vitamina D₂, que es liberado en exceso por el agente de liberación. La cantidad del anticuerpo que no es de ensayo es suficiente para ajustar la cantidad de señal obtenida en el ensayo para compensar la cantidad del homólogo de vitamina D₂ liberado en exceso de la cantidad de homólogo de vitamina D₃. El tratamiento del medio que comprende los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ puede llevarse a cabo en una etapa separada o puede llevarse a cabo junto con el ensayo usando un anticuerpo de ensayo.

En el ejemplo anterior, el anticuerpo de ensayo está enlazado a una molécula pequeña, que está unida a una pareja de unión para la molécula pequeña en una partícula quimioluminiscente. Este reactivo quimioluminiscente se puede formar previamente o formarse *in situ*. Los homólogos de analito de vitamina D compiten con el reactivo de partícula-análogo para unirse al anticuerpo de ensayo para la vitamina D. Si los homólogos de analito de vitamina D están presentes, será menor el número de moléculas de reactivo de partícula-análogo que se acercan al reactivo quimioluminiscente. Por tanto, habrá una disminución en la señal de ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el reactivo quimioluminiscente cuando los dos marcadores están muy cerca. El reactivo quimioluminiscente activado produce posteriormente luz, donde se observa una disminución de la señal en presencia del analito. La cantidad de luz producida se refiere a la cantidad del complejo formado, que, a su vez, está relacionada con la cantidad total de homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ presentes en la muestra.

En otro ejemplo particular de un inmunoensayo de luminiscencia inducida que usa vitamina D como ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, el ensayo usa una partícula que se ha asociado con un compuesto quimioluminiscente donde un análogo de vitamina D se une a la partícula (reactivo de partícula-análogo). Se emplea un reactivo fotosensibilizador que comprende un anticuerpo de ensayo que presenta una afinidad de unión por el homólogo de vitamina D₂ que es superior a su afinidad de unión por el homólogo de vitamina D₃. El anticuerpo de ensayo está enlazado a una molécula pequeña que, a su vez, está unida a una pareja de unión para la molécula pequeña en una partícula quimioluminiscente.

En este ejemplo, el anticuerpo de ensayo presenta una afinidad de unión por el homólogo de vitamina D₂ que es superior a su afinidad de unión por los homólogos de vitamina D₃. La muestra se trata previamente con un agente de liberación, que proporciona la liberación de cantidades esencialmente iguales de los homólogos de vitamina D a partir de sustancias de unión endógenas. En conformidad con los principios descritos en el presente documento, se incuban anticuerpos que no es de ensayo preparado como se ha descrito anteriormente con el medio que comprende los homólogos liberados. El anticuerpo que no es de ensayo presenta una afinidad de unión preferencial por el homólogo de vitamina D₂, por el que el anticuerpo de ensayo tiene una mayor afinidad de unión. La cantidad del anticuerpo que no es de ensayo es suficiente para ajustar la cantidad de señal obtenida en el ensayo para compensar la cantidad del homólogo de vitamina D₂ que está unido por el anticuerpo del ensayo en una cantidad superior a la cantidad de homólogo de vitamina D₃. El tratamiento del medio que comprende los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ se lleva a cabo junto con el ensayo usando un anticuerpo de ensayo.

Tanto los homólogos de vitamina D₂ como los de vitamina D₃ compiten con el reactivo de partícula-análogo para unirse al anticuerpo de ensayo para la vitamina D. Si los homólogos de analito de vitamina D están presentes, será menor el número de moléculas de reactivo de partícula-análogo que se acercarán al reactivo fotosensibilizador. Por tanto, habrá una disminución en la señal de ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente del reactivo de partícula-análogo cuando los dos marcadores están muy cerca. El compuesto quimioluminiscente activado produce posteriormente luz, donde se observa una disminución de la señal en presencia del analito. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad de los complejos formados, que, a su vez, está relacionada con la cantidad de homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ presentes en la muestra.

En otro ejemplo particular de un ensayo de luminiscencia inducida que usa vitamina D a modo de ilustración y no de limitación, se emplea una partícula fotosensibilizadora que se conjuga con una pareja de unión para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina (que son parejas de unión para la biotina). Se emplea un reactivo de anticuerpo de ensayo que comprende biotina unida a un anticuerpo de ensayo que se une a los dos homólogos de analito de vitamina D. Se emplea un reactivo quimioluminiscente como parte del sistema de detección.

En este ejemplo, el anticuerpo de ensayo presenta una afinidad de unión por el homólogo de vitamina D₂ que es

superior a su afinidad de unión por los homólogos de vitamina D₃. Asimismo, la muestra se trata previamente con un agente de liberación y el homólogo de vitamina D₂ se libera de sustancias de unión endógenas en una cantidad superior a la del homólogo de vitamina D₃. En conformidad con los principios descritos en el presente documento, se incuba un anticuerpo que no es de ensayo preparado como se ha descrito anteriormente con el medio que comprende los homólogos liberados. El anticuerpo que no es de ensayo presenta una afinidad de unión preferencial por el homólogo de vitamina D₂, por el que el anticuerpo de ensayo tiene una mayor afinidad de unión y que se libera de las sustancias de unión endógenas en una cantidad superior a la del homólogo de vitamina D₃. La cantidad del anticuerpo que no es de ensayo es suficiente para ajustar la cantidad de señal obtenida en el ensayo para compensar la cantidad del homólogo de vitamina D₂ que está unido por el anticuerpo del ensayo en una cantidad superior a la cantidad de homólogo de vitamina D₃ y la cantidad del homólogo de vitamina D₂ que se libera en exceso de la cantidad de homólogo de vitamina D₃ liberada. El tratamiento del medio que comprende los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ se lleva a cabo junto con el ensayo usando un anticuerpo de ensayo.

El medio de reacción que comprende los reactivos anteriores se incuba para permitir que la avidina o la estreptavidina de las partículas fotosensibilizadoras se una a la biotina del reactivo de anticuerpo de ensayo en virtud de la unión entre la avidina y la biotina, y también para permitir la unión específica entre el anticuerpo de ensayo del reactivo de anticuerpo de ensayo, que ahora está unido a las partículas fotosensibilizadoras, para unirse a los homólogos de analito de la muestra y al analito que forma parte del reactivo quimioluminiscente. La incubación también permite la unión entre el anticuerpo que no es de ensayo y el homólogo de analito de vitamina D₂. A continuación, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que tiene la capacidad, en su estado excitado, de activar el oxígeno hasta un estado de singlete. Debido a que ahora menos reactivo quimioluminiscente está muy cerca del fotosensibilizador debido a la presencia de los homólogos de analito, hay menos activación del reactivo quimioluminiscente por el oxígeno singlete y menos luminiscencia. A continuación, el medio se examina en cuanto a la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, su presencia está relacionada con la presencia y/o la cantidad de los homólogos de analito donde se observa una disminución de la señal en presencia del analito. La cantidad de luz producida se refiere a la cantidad del complejo formado, que, a su vez, está relacionada con la cantidad de homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ presentes en la muestra.

Otro ejemplo de un formato de ensayo para la detección de vitamina D, a modo de ilustración y no de limitación, en una muestra está el formato de ensayo ACMIA. Para el formato de ensayo ACMIA, se emplean partículas de cromo, que están recubiertas con vitamina D o un análogo de vitamina D (reactivo de partículas de cromo), como primer componente. Un segundo componente es un reactivo de anticuerpo de ensayo que comprende un primer anticuerpo de ensayo para los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃. En el reactivo de anticuerpos, el primer anticuerpo de ensayo se une por medio de un grupo de enlace a una enzima indicadora (por ejemplo, β -galactosidasa) para formar un conjugado de anticuerpo-enzima de ensayo.

En este ejemplo, el anticuerpo de ensayo presenta una afinidad de unión esencialmente equivalente por los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃. Sin embargo, la muestra se trata previamente con un agente de liberación y el homólogo de vitamina D₂ se libera de sustancias de unión endógenas en una cantidad superior a la del homólogo de vitamina D₃. En conformidad con los principios descritos en el presente documento, se incuba un anticuerpo que no es de ensayo preparado como se ha descrito anteriormente con el medio que comprende los homólogos liberados. El anticuerpo que no es de ensayo presenta una afinidad de unión preferencial por el homólogo de vitamina D₂, que es liberado en exceso por el agente de liberación. La cantidad del anticuerpo que no es de ensayo es suficiente para ajustar la cantidad de señal obtenida en el ensayo para compensar la cantidad del homólogo de vitamina D₂ liberado en exceso de la cantidad de homólogo de vitamina D₃. El tratamiento del medio que comprende los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ puede llevarse a cabo en una etapa separada o puede llevarse a cabo junto con el ensayo usando un anticuerpo de ensayo.

Se trata un medio que comprende la muestra con un segundo reactivo de anticuerpo de ensayo, que comprende un segundo anticuerpo de ensayo que presenta una afinidad de unión de ensayo esencialmente equivalente por cada uno de los homólogos de analito de vitamina D; el segundo anticuerpo de ensayo se une a los homólogos de vitamina D en la muestra. El medio también contiene un anticuerpo que no es de ensayo como se ha analizado anteriormente. El conjugado de anticuerpo-enzima se mezcla con la muestra en el medio para permitir que los homólogos del analito de vitamina D se unan al primer anticuerpo de ensayo. A continuación, se añade el reactivo de partículas de cromo para unir cualquier exceso de conjugado de anticuerpo-enzima. A continuación, se aplica un imán, que extrae todas las partículas de cromo y el exceso de enzima-anticuerpo fuera de la suspensión, y el sobrenadante se transfiere a un recipiente de reacción final. Se añade el sustrato de la enzima indicadora al recipiente de reacción final, y se mide espectrofotométricamente la actividad enzimática como un cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo. La cantidad de esta señal está relacionada con la cantidad de ambas formas homólogas de la vitamina D en la muestra.

Otro ejemplo de un ensayo para formas homólogas de vitamina D (a modo de ilustración y no de limitación) en una muestra es un inmunoensayo de marcador de éster de acridinio que usa partículas paramagnéticas como fase sólida (inmunoensayo ADVIA). El sistema de detección empleado para este ejemplo de un ensayo de vitamina D incluye una vitamina D (fracción de captura) marcada con una molécula pequeña como conjugado de molécula pequeña o conjugado de captura, pareja de unión para las partículas de látex paramagnético recubiertas de moléculas pequeñas

como fase sólida (FS), y un anticuerpo de ensayo marcado con éster de acridinio para los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ (anticuerpo de detección). La molécula pequeña puede ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína y la respectiva pareja de unión puede ser estreptavidina o anticuerpo para la fluoresceína. El análogo de vitamina D puede estar enlazado a la molécula pequeña directamente o a través de un grupo de enlace tal como, por ejemplo, una proteína, por ejemplo, seroalbúmina bovina (BSA). Los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ de la muestra de un paciente compiten con el análogo de vitamina D de la fracción de captura para unirse al anticuerpo de ensayo anti-vitamina D de detección marcado con éster de acridinio.

La muestra sospechosa de contener homólogos de vitamina D se somete a un pretratamiento con 1,8-ANS. En este ejemplo, el anticuerpo de ensayo presenta una afinidad de unión esencialmente equivalente por los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃. Sin embargo, como resultado del pretratamiento con 1,8-ANS, el homólogo de vitamina D₂ se libera de sustancias de unión endógenas en una cantidad superior a la del homólogo de vitamina D₃. En conformidad con los principios descritos en el presente documento, se incubaba un anticuerpo que no es de ensayo preparado como se ha descrito anteriormente con el medio que comprende los homólogos liberados. El anticuerpo que no es de ensayo presenta una afinidad de unión preferencial por el homólogo de vitamina D₂, que es liberado en exceso por el agente de liberación. La cantidad del anticuerpo que no es de ensayo es suficiente para ajustar la cantidad de señal obtenida en el ensayo para compensar la cantidad del homólogo de vitamina D₂ liberado en exceso de la cantidad de homólogo de vitamina D₃. El tratamiento del medio que comprende los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ con el anticuerpo que no es de ensayo puede llevarse a cabo en una etapa separada o puede llevarse a cabo junto con el ensayo usando un anticuerpo de ensayo. El ensayo puede llevarse a cabo usando un aparato ADVIA CENTAUR®, ADVIA CENTAUR® XP o ADVIA CENTAUR® CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante proporcionadas con el mismo.

Otro ejemplo de un ensayo para un analito de acuerdo con los principios descritos en el presente documento es un inmunoensayo de marcador de éster de acridinio que usa partículas paramagnéticas como fase sólida (inmunoensayo ADVIA). El sistema de detección empleado para este ejemplo de un ensayo para homólogos de vitamina D incluye un reactivo de anticuerpo de ensayo que comprende un anticuerpo de ensayo y una molécula pequeña enlazada al anticuerpo de ensayo (anticuerpo de captura) como un conjugado de captura, partículas de látex paramagnéticas como una fase sólida (FS) recubierta con una pareja de unión para la molécula pequeña del reactivo de anticuerpo de ensayo y un análogo de analito de vitamina D marcado con éster de acridinio (hapteno de detección). El marcador de éster de acridinio puede unirse directamente al análogo de analito para formar el hapteno de detección o puede emplearse un grupo de enlace que incluye, por ejemplo, una proteína tal como, por ejemplo, BSA. Los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ de una muestra compiten con el hapteno de detección marcado con éster de acridinio para unirse al anticuerpo de ensayo.

En este ejemplo, el anticuerpo de ensayo presenta una afinidad de unión por el homólogo de vitamina D₂ que es superior a su afinidad de unión por los homólogos de vitamina D₃. La muestra sospechosa de contener los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ se somete a un pretratamiento con uno o más de un agente de liberación y un agente de digestión, que proporciona la liberación de cantidades esencialmente iguales de los homólogos de vitamina D a partir de sustancias de unión endógenas. En conformidad con los principios descritos en el presente documento, se incubaba un anticuerpo que no es de ensayo preparado como se ha descrito anteriormente con el medio que comprende los homólogos liberados. El anticuerpo que no es de ensayo presenta una afinidad de unión preferencial por el homólogo de vitamina D₂, por el que el anticuerpo de ensayo tiene una mayor afinidad de unión. La cantidad del anticuerpo que no es de ensayo es suficiente para ajustar la cantidad de señal obtenida en el ensayo para compensar la cantidad del homólogo de vitamina D₂ que está unido por el anticuerpo del ensayo en una cantidad superior a la cantidad de homólogo de vitamina D₃. El tratamiento del medio que comprende los homólogos de vitamina D₂ y vitamina D₃ se lleva a cabo junto con el ensayo usando el reactivo de anticuerpo de ensayo.

El ensayo anterior puede llevarse a cabo usando un aparato ADVIA CENTAUR®, ADVIA CENTAUR® XP o ADVIA CENTAUR® CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante proporcionadas con el mismo. En variaciones de los ensayos de éster de acridinio anteriores, la molécula pequeña puede ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína, y las parejas de unión para la molécula pequeña pueden ser, por ejemplo, avidina o estreptavidina o anticuerpo para la fluoresceína, respectivamente.

Etapas de examen

En una etapa de un método de ensayo, se examina el medio para detectar la presencia de un complejo que comprenda formas homólogas de un analito y un anticuerpo para un analito de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. La cantidad de los complejos indica la cantidad de formas homólogas del analito en la muestra.

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

"determinación", así como otros sinónimos comunes para la medición, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

5 En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio. La presencia y/o la cantidad de la señal están relacionadas con la presencia y/o la cantidad de las formas homólogas de un analito en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza del sistema de producción de señal. Como se ha mencionado anteriormente, existen numerosos métodos mediante los que un marcador de una señal que produce señal puede producir una señal detectable por medios externos. La activación de un sistema de producción de señal depende de la naturaleza de los elementos del sistema de producción de señal.

10 Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían de 10 °C a 70 °C o de 20 °C a 45 °C, o de 20 °C a 25 °C, por ejemplo. En un enfoque, se forman curvas patrón usando concentraciones conocidas de analito de vitamina D como se ha descrito anteriormente. También pueden usarse calibradores y otros controles.

15 La luminiscencia o la luz producida a partir de cualquier marcador se puede medir visualmente, fotográficamente, actinométricamente, espectrofotométricamente, tal como mediante el uso de un fotomultiplicador o un fotodiodo, o mediante cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad de la misma, que está relacionada con la cantidad de homólogos de analito del medio. El examen de la presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que es, en general, simplemente una etapa en donde se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser, pero sin limitación, un espectrofotómetro, fluorímetro, espectrómetro de absorción, luminómetro y quimioluminómetro, por ejemplo.

20 Kits que comprenden reactivos para realizar los ensayos

Se pueden preparar kits para realizar ensayos en porciones de una muestra sospechosa de contener formas homólogas de un analito. Los kits comprenden reactivos de anticuerpos que incluyen al menos un anticuerpo de ensayo para los homólogos de analito en una muestra. Los kits comprenden además un receptor que no es de ensayo de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. Una cantidad del receptor que no es de ensayo es suficiente para lograr un ajuste de la contribución de uno de los dos homólogos de analito a la señal. El kit puede incluir además otros reactivos para realizar el ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo en particular.

Los reactivos pueden estar, cada uno, en recipientes distintos, o diversos reactivos pueden combinarse en uno o más recipientes, dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos acondicionados por separado para realizar un ensayo, tal como miembros adicionales de pares de unión específicos, elementos del sistema de producción de señal y reactivos auxiliares, por ejemplo.

Las cantidades relativas de los diferentes reactivos en los kits pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen esencialmente las reacciones que necesitan producirse durante los presentes métodos y, además, para optimizar esencialmente la sensibilidad de un ensayo. En circunstancias adecuadas, pueden proporcionarse uno o más de los reactivos en el kit como polvo seco, normalmente liofilizado, incluyendo excipientes, que, al disolverse, proporcionarán una solución de reactivo con las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo usando un reactivo compuesto de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. El kit puede incluir además una descripción por escrito de un método que utiliza reactivos que incluyen un reactivo compuesto de acuerdo con los principios descritos en el presente documento.

La "primera" y "segunda" designación como se usa en el presente documento es completamente arbitraria y no pretende sugerir ningún orden o clasificación entre las fracciones mencionadas o cualquier orden de adición de fracciones en los presentes métodos.

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

45 La siguiente descripción está dirigida a ejemplos específicos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento a modo de ilustración y no de limitación; los ejemplos específicos no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación y las reivindicaciones adjuntas. Numerosas modificaciones y composiciones alternativas, pueden idearse métodos y sistemas sin apartarse del espíritu ni del alcance de la presente divulgación.

Ejemplos

50 Salvo que se indique otra cosa, los materiales en los siguientes experimentos se pueden adquirir en Sigma-Aldrich Chemical Corporation (St. Louis MO) o Fluka Chemical Corporation (Milwaukee WI). Las partes y los porcentajes desvelados en el presente documento son en peso a volumen a menos que se indique lo contrario.

Definiciones:

mg =	miligramo
g =	gramo(s)
ng =	nanogramo(s)
ml =	mililitro(s)
µl =	microlitro(s)
µmol =	micromolar
°C =	grados centígrados
min =	minuto o minutos
s =	segundo(s)
h =	hora(s)
p/v =	peso a volumen
v/v =	volumen a volumen
EDA =	etilendiamina
EDAC =	Clorhidrato de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
sulfoNHS o SNHS =	sulfo- <i>N</i> -hidroxisuccinimida
TLC =	cromatografía en capa fina
HPLC =	cromatografía líquida de alto rendimiento
EDTA =	etilendiaminotetraacetato
PEG =	polietilenglicol
EtOAc =	acetato de etilo
DMF =	dimetilformamida
DMSO =	dimetilsulfóxido
MeOP =	1-metoxi-2-propanol
MES =	ácido 2-(<i>N</i> -morfolin)etanosulfónico
DI =	destilado
UPA =	Analizador de ultrapartículas (del inglés, Ultra Particle Analyzer)
LOCI =	inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente (del inglés, Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay)
Ac =	anticuerpo

Preparación de un anticuerpo de ensayo biotinilado que presenta una afinidad de unión de ensayo esencialmente equimolar por 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃

- 5 Se mezcló una solución (0,8 ml a 2,63 mg/ml) de anticuerpo 5H10 de vitamina D (monoclonal de oveja de Bioventix, Farnham, Surrey, RU) en PO₄ 10 mM, NaCl 300 mM, a pH 7,0 con 43,2 µl de una solución acuosa (2,0 mg/ml) de NHS-dPEG@4-biotina (Quanta Biodesign Ltd., Powell OH, número de pieza 10200). La cantidad de reactivo de biotinilación añadida representa una exposición molar de 10 veces del agente de biotinilación con el anticuerpo. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas y luego la reacción se inactivó mediante la adición de 80 µl de TRIS 0,5 M. La mezcla de reacción se sometió a intercambio de tampón con PO₄ 10 mM, NaCl 10 300 mM, pH 7,0, en un dispositivo AMICON® (YM10) hasta que la absorción a 260 nm del efluente fue ≤ 0,03. La solución de anticuerpos (1,04 ml a 2,1 mg/ml de proteína) se mezcló con 10 µl de PROCLIN® 300 y se filtraron 10 µl de una solución acuosa de sulfato de neomicina (10 mg/ml) usando un filtro de jeringa ACRODISC® de 0,2 µm (Pall Corporation), y se almacenó a 2-8 °C.

Preparación de perlas de EPRM-EDA

- 15 Se añaden perlas de EPRM (2000 mg, 20,0 ml) a un vial de 40 ml. Las perlas de EPRM se preparan mediante un procedimiento similar al descrito en la patente de EE.UU. n.º 7.179.660 y el compuesto quimioluminiscente es 2-(4-(*N,N*-di-tetradecil)-anilin-3-feniltioxeno con quelato de europio. Se combina EDA (800 mg, 890 µl) con 10 ml de tampón MES pH 6 (el "tampón") y 4,2 ml de HCl 6 N. El pH de la mezcla es, o se ajusta para ser, 6,9. Se añade la solución de EDA a las perlas de EPRM con agitación con formación de vórtice, y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se combina cianoborohidruro de sodio (400 mg) en un vial de 15 ml con 10 ml de agua desionizada y se añade la combinación a la mezcla de perlas anterior. La mezcla se agita a 37 °C durante 18-20 horas. Se transfieren las perlas a seis tubos de centrifuga de 40 ml. Se añade tampón MES para llevar el volumen a 35 ml y la mezcla se centrifuga a 19.000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se decanta y las perlas se vuelven a suspender en 2 ml del tampón con una varilla agitadora, y se añade tampón adicional a 35 ml. Se somete la mezcla a ultrasonidos a 18 vatios de potencia durante 30 segundos, usando hielo para mantener fría la mezcla. La etapa de lavado/ultrasonidos se realiza 4 veces para eliminar todos los productos químicos de activación. Después de la última centrifugación del tampón MES, se añaden 2 ml del tampón que contiene MeOP al 5 % y Tween® 20 al 0,1 % (el "segundo tampón") a los tubos para la etapa de resuspensión. Se añade un segundo tampón adicional a 35 ml antes de los ultrasonidos. Se centrifuga la suspensión de perlas a 19.000 rpm durante 30 min. Se desecha el sobrenadante.
- 30 El tratamiento con ultrasonidos final usó 12 ml del segundo tampón en cada tubo para dar una dilución de 25 mg/ml. El tamaño de partícula es de 277 nm de acuerdo con lo determinado en un instrumento UPA.

Se prepara la perla Chemibead de EPRM de manera similar al método descrito en la patente de EE.UU. n.º 6.153.442 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20050118727A. La perla Chemibead de EPRM comprende una capa interna de aminodextrano y una capa externa de aldehído de dextrano que tiene funcionalidades de aldehído libres. Véase, por ejemplo, patentes de EE.UU. n.º 5.929.049, 7.179.660 y 7.172.906. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 0 a 40 °C durante un período de 16 a 64 horas a un pH de 5,5 a 7,0, o 6, en un medio acuoso tamponado empleando un tampón adecuado tal como, por ejemplo, MES. La reacción se inactiva mediante la adición de un agente de inactivación adecuado tal como, por ejemplo, hemiclrorhidrato de carboximetoxiamina (CMO), y el posterior lavado de las partículas.

Se hacen reaccionar los grupos aldehído en la capa exterior de aldehído de dextrano con etilendiamina en condiciones de aminación reductora para formar el reactivo EPRM-EDA que tiene fracciones colgantes que comprenden una cadena de etileno y un grupo amina terminal. Las condiciones de aminación reductora incluyen el uso de un agente reductor tal como, por ejemplo, un hidruro metálico. La reacción se lleva a cabo en un medio acuoso a una temperatura durante la reacción de 20 °C a 100 °C durante un período de 1 hora a 48 horas.

Síntesis de 3-carbamato de 25-OH-Vitamina D₃ (3-carbamato de 25-OH Vitamina D₂)

Se agitó una mezcla de 22 mg (55 µmol) de 25-OH-VD₃ adquirida en ChemReagents.com, Sugarland TX, 100 mg (420 µmol) de carbonato de disuccinimidilo (DSC), 100 µl de trietilamina en 1 ml de acetonitrilo anhidro en un matraz de 5 ml (cubierto con papel de aluminio) a temperatura ambiente durante 18 horas bajo nitrógeno para preparar 25-OH-VD₃ activado. La TLC (EtOAc: Hexano = 2: 1) no mostró material de partida restante. Se preparó una suspensión añadiendo 150 mg de hemiclrorhidrato de carboximetoxiamina (CMO), 0,3 ml de trietilamina y 1 ml de DMF en un matraz de 10 ml. Se añadió gota a gota una solución que contenía 25-OH-VD₃ activada a la suspensión de CMO con agitación, que continuó durante otras 18 h. Se aplicó vacío para eliminar los disolventes en la mayor medida posible (la temperatura del baño de calentamiento no debe ser superior a 50 °C). Se añadió EtOAc (25 ml) al residuo, que se lavó tres veces con 2 ml de salmuera. Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se filtró; se eliminó el disolvente usando rotavapor. El producto en bruto (42 mg) se obtuvo después del secado y se purificó mediante HPLC. Se obtuvo producto puro (24 mg) después de secar a alto vacío. El producto se disolvió en 1,2 ml de DMSO anhidro. Se transfirieron alícuotas a viales, que se mantuvieron a -70 °C.

Acoplamiento de EPRM-EDA y 3-carbamato de 25-OH-Vitamina D₃ para dar reactivo de quimioterapia

Se añadió 3-carbamato de 25-OH-Vitamina D₃ (10 µl de alícuota en DMSO preparado como se ha descrito anteriormente) (0,2 mg) a un vial de 2 ml. Se añadieron EDAC (6,8 mg) y SNHS (9,4 mg) más 2,27 ml de DMSO seco (3 mg/ml) a un vial de 5 ml. Se combinó la solución de EDAC/SNHS (190 µl) con el contenido del vial de 2 ml anterior (1 mg/ml) para preparar 3-carbamato de 25-OH-vitamina D₃ activado. Se dejó centrifugar la mezcla a temperatura ambiente durante 18 h. Se diluyó una parte alícuota de 0,4 ml de una solución de tensioactivo GAFAC® al 16 % (GAF Corporation, Wayne NJ) (0,15 %) hasta el 1,6 % con 3,6 ml de agua DI.

Se combinaron la vitamina D₃ (8,5 mg) y 850 µl de DMSO (10 mg/ml). A un matraz de fondo redondo de 10 ml (etiquetado 3323-064B) dotado de una barra de agitación, se añadieron 2,0 ml (200 mg) de EPRM-EDA, seguidos de 400 µl (4 mg) de la solución de vitamina D₃ anterior. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente.

A un matraz de fondo redondo de 10 ml dotado de una barra de agitación, se añadieron 2,0 ml (200 mg) de EPRM-EDA (preparado como se ha descrito anteriormente), seguidos de 260 µl de solución de tensioactivo GAFAC® al 1,6 % (0,15 %) con agitación moderada. A un tubo de ensayo pequeño, se añadieron 504 µl de DMSO anhidro, seguidos de 60 µl (0,06 mg) de 3-carbamato de vitamina D₃ activado preparado como se ha descrito anteriormente; y se añadió la mezcla a la mezcla de perlas de EPRM-EDA. El contenido total de DMSO de la suspensión de perlas fue del 20 %. El recipiente de reacción se dejó agitar durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, las perlas se lavaron mediante diafiltración.

Cada lote de perlas se tomó hasta 20 ml de volumen de trabajo con tampón de MeOP al 10 %/GAFAC® al 1 %/MES a pH 6. Se sometió la mezcla a diafiltración con 5 volúmenes del tampón y luego se sometió a ultrasonidos con un dispositivo de ultrasonidos de sonda a 18-21 vatios usando hielo para mantener fría la mezcla. La diafiltración/el tratamiento de ultrasonidos continuó a través de 50 volúmenes, y se tomaron muestras de efluentes a 35, 40, 45 y 50 volúmenes. Se cambió el tampón a tampón de lavado de hapteno para LOCI (HEPES 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, sulfato de neomicina al 0,01 %, TRITON® 405X al 0,1 % y PROCLIN® 300 al 0,15 %, pH 7,2), usándose 10 volúmenes. Se redujo la mezcla hasta 7 ml y se realizó un UPA. Los tamaños de partícula fueron de 3323-064A = 289 nm y 3323-064B = 298 nm. Se determinó el porcentaje de sólidos, y se llevó el lote de perlas hasta 10 mg/ml con tampón de lavado de hapteno para LOCI a pH 7,2. El rendimiento fue de 160,4 mg.

Ensayo para determinar la cantidad total de 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃

Los ensayos se llevaron a cabo en un analizador DIMENSION® VISTA® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.,

Deerfield, IL) siguiendo el protocolo para un ensayo LOCI y usando soluciones de calibración que contenían cantidades variables de 25-hidroxivitamina D₃. En este ejemplo, el ensayo usa, como reactivo quimioluminiscente, el reactivo de perla Chemibead preparado como se ha descrito anteriormente. La muestra sospechosa de contener vitamina D se somete a un pretratamiento con tricloroacetato de sodio al 5 % y salicilato de sodio al 6 % en tampón HEPES a pH 7,5 (HEPES 5 mM, HEPES de sodio 4,9 mM, cloruro de sodio 300 mM, etilenglicol al 10 %, colato de sodio 12,26 mM y PLURONIC® 25R2 al 0,20 %).

Las condiciones para el pretratamiento son las siguientes: se incuban 8 µl de muestra de suero que contiene 45 ng/ml de 25-hidroxivitamina D₂ o 25-hidroxivitamina D₃ con el reactivo de pretratamiento anterior y el reactivo de anticuerpo de ensayo biotinilado durante 18 minutos. A continuación, se añade reactivo de perlas Chemibead recubiertas con 25-OH-D₃ para eliminar el anticuerpo de ensayo biotinilado no reaccionado (no unido). A continuación, se añade reactivo Sensibead recubierto con estreptavidina para generar la señal de LOCI para el anticuerpo de ensayo no unido. La concentración de 25-hidroxivitamina D es inversamente proporcional a la señal de LOCI. Como resultado del pretratamiento, una cantidad de 25-hidroxivitamina D₂ liberada de sustancias de unión endógenas y unida al anticuerpo de ensayo fue de 63 ng/ml y una cantidad de 25-hidroxivitamina D₃ liberada de sustancias de unión endógenas fue de 42 ng/ml. Como es evidente, la cantidad de 25-hidroxivitamina D₂ liberada fue superior a la cantidad de 25-hidroxivitamina D₃ liberada.

La muestra se hace reaccionar con el reactivo de anticuerpo de ensayo biotinilado preparado como se ha descrito anteriormente y luego con el reactivo de Chemibead. Se emplea anticuerpo 3A10 de vitamina D (anticuerpo monoclonal de ratón de Bioventix Inc., Farnham, Surrey, RU) como un anticuerpo que no es de ensayo como solución, y el anticuerpo que no es de ensayo está presente en una cantidad de 40 µg/ml (o 53 veces la del anticuerpo 5H10) para compensar la cantidad en exceso de 25-hidroxivitamina D₂ liberada frente a la cantidad de 25-hidroxivitamina D₃ liberada. Las perlas Chemibead se unen a la fracción de los sitios de unión de anticuerpos monoclonales que no está ocupada por el analito de la muestra. Posteriormente, se añaden perlas sensibilizadoras acopladas a estreptavidina a la mezcla de reacción. Esto conduce a la formación de pares de Cemibead/Sensibead, cuya concentración es inversamente proporcional una concentración de ambas formas de la vitamina D (primera parte de la muestra) o la forma epi de vitamina D (segunda parte de la muestra). Tras la iluminación a 680 nm, las perlas sensibilizadoras generan oxígeno singlete que se difunde en las perlas Chemibead que se combinan con las Semibead, reacciona con el colorante olefínico y genera una señal quimioluminiscente a aproximadamente 612 nm que es inversamente proporcional a la concentración de analito.

La perla sensibilizadora de estreptavidina ("Sensibead(s)") se prepara usando un método análogo al descrito en las patentes de EE.UU. n.º 6.153.442, 7.022.529, 7.229.842 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20050118727A. El fotosensibilizador fue bis-(trihexil)-silicio-*t*-butil-ftalocianina. La concentración del reactivo de Sensibead fue de 200 µg/ml en tampón HEPES, pH 8,0 que contiene NaCl 150 mM. El reactivo de partículas de EPRM-EDA-25-OH-vitamina D₃ preparado como se ha descrito anteriormente se empleó como el "reactivo químico" a una concentración de 200 µg/ml en tampón HEPES, pH 7,2, que contenía NaCl 150 mM y detergente al 0,1 %.

En el tiempo t = cero segundos, se añadieron 20 µl de reactivo de anticuerpo biotinilado y 20 µl de agua a un recipiente de reacción. Se añadió muestra, 12 µl, 21,6 segundos después, seguida de 8 µl de agua. En t = 414,0 segundos, se añadieron 40 µl de reactivo de Chemibead, seguidos de 20 ml de agua. El reactivo de Sensibead se dispensó luego a los 457,2 segundos. Las medidas se tomaron 601,2 segundos después del inicio de la secuencia de reacción.

Usando el formato de ensayo anterior, se llevaron a cabo ensayos en muestras de suero que contenían cantidades variables de 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃. El ensayo anterior se repitió usando anticuerpos monoclonales 5F6 y 6F11 (ambos monoclonales de oveja de Bioventix, Farnham, Surrey, RU), respectivamente, en lugar del anticuerpo monoclonal 10H9.

Se ha de entender que los ejemplos descritos anteriormente son meramente ilustrativos de algunos de los muchos ejemplos específicos que representan los principios descritos en el presente documento. De manera clara, los expertos en la materia pueden idear fácilmente otras numerosas disposiciones sin apartarse del alcance definido por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar, en una muestra, una cantidad total de 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃, comprendiendo el método:

(a) proporcionar en combinación en un medio de ensayo:

- 5 (i) una muestra sospechosa de contener 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃,
(ii) reactivos para realizar un ensayo para determinar la 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃, en donde los reactivos comprenden un anticuerpo de ensayo capaz de unirse a la 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃ para formar complejos y un elemento de un sistema de producción de señal que produce una señal en relación con la cantidad de complejos de 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃, e
- 10 (iii) un anticuerpo que no es de ensayo que tiene una mayor afinidad de unión por la 25-hidroxitamina D₂, en donde una cantidad del anticuerpo que no es de ensayo es suficiente para lograr un ajuste de la contribución de la 25-hidroxitamina D₂ a la cantidad de señal, en donde la cantidad del anticuerpo no analizado es de 10 µg/ml a 75 µg/ml;
- (b) incubar el medio de ensayo en condiciones para formar los complejos;
- 15 (c) determinar la cantidad de señal de los complejos y relacionar la cantidad de señal con la cantidad total de 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃ en la muestra.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el elemento del sistema de producción de señal es un análogo de analito de vitamina D que comprende un marcador, en donde el análogo de vitamina D es capaz de unirse al anticuerpo de ensayo.

20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los reactivos para realizar el ensayo comprenden además una partícula.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el elemento del sistema de producción de señal comprende un reactivo fotosensibilizador, y los reactivos de ensayo comprenden además una partícula quimioluminiscente, en donde el reactivo fotosensibilizador comprende preferentemente una partícula.

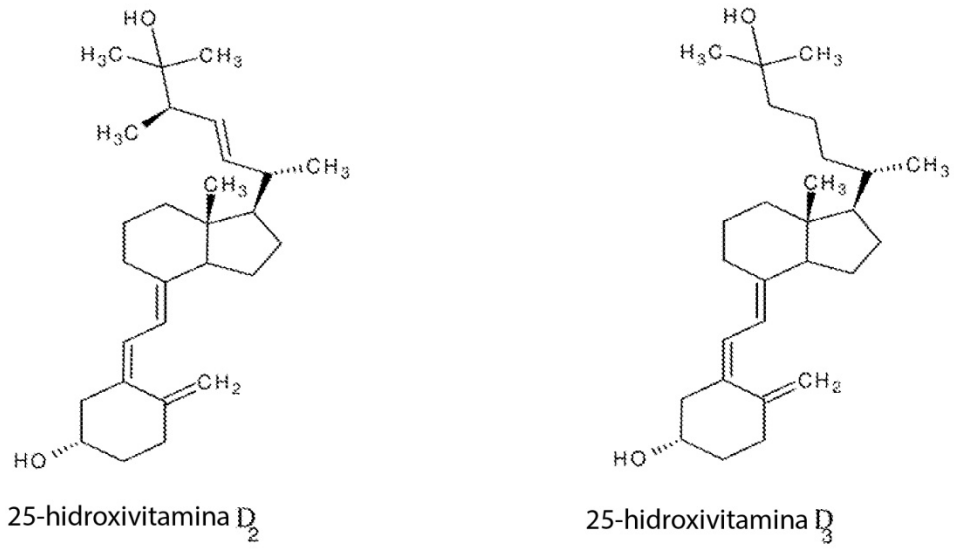


FIG. 1