

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 236**

51 Int. Cl.:

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/548 (2006.01)

G01N 33/549 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2005 E 05826152 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 1960783**

54 Título: **Reducción de unión no específica en ensayos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.08.2015

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
1717 DEERFIELD ROAD
DEERFIELD, IL 60015, US**

72 Inventor/es:

**TENG, ZHU;
MOORE, JEFFREY L.;
CRAIG, ALAN R.;
HICKEY, GARY;
SCHELP, CARSTEN y
WEI, TIE QUAN**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 544 236 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).

REDUCCIÓN DE UNIÓN NO ESPECÍFICA EN ENSAYOS**DESCRIPCIÓN****5 Antecedentes de la invención**

En los campos de la medicina y la química clínica, se llevan a cabo muchos estudios y determinaciones de especies fisiológicamente reactivas tales como células, proteínas, enzimas, cofactores, ácidos nucleicos, sustratos, antígenos, anticuerpos, etc. usando conjugados que implican miembros de par de unión específica o etiquetas o similares. Se conocen diversas técnicas de ensayo que implican la unión de miembros de par de unión específica. Estas técnicas de ensayo también implican generalmente una etiqueta usada en la parte de detección del ensayo.

Se han conjugado polisacáridos, particularmente dextrano, con miembros de par de unión específica, por ejemplo, para aumentar la estabilidad del miembro de par de unión específica. En algunos enfoques, un polisacárido se une a una superficie de un soporte y un miembro de par de unión específica se une al polisacárido para proporcionar una superficie recubierta con polisacárido y que tiene un miembro de par de unión específica unido a la misma. Tales soportes se emplean en ensayos para analitos. La conjugación de miembros de par de unión específica con polisacáridos aumenta la voluminosidad de estas moléculas, lo que puede potenciar su eficacia en ensayos que implican miembros de par de unión específica al interferir con la unión a miembros complementarios de par de unión específica. Adicionalmente, estos conjugados, cuando están presentes sobre una superficie, permiten la unión específica de un miembro complementario de par de unión específica a la superficie con unión no específica reducida. Los conjugados de polisacárido se emplean en numerosos tipos de ensayos, incluyendo ensayos homogéneos y heterogéneos, etc., que se realizan en muestras biológicas tales como sangre, suero, y similares.

Sin embargo, hay determinadas muestras tales como, por ejemplo, muestras de suero, que producen un resultado positivo independientemente de la presencia o ausencia de un analito en ensayos en los que se emplean los soportes recubiertos con polisacárido mencionados anteriormente. La posible explicación para este resultado es la unión no específica de componentes de la muestra a uno o más de los reactivos de ensayo, particularmente el soporte recubierto con polisacárido con miembro de par de unión específica unido. La unión no específica puede aumentar la lectura de un resultado de prueba positivo, y en algunos casos, la unión no específica puede producir una lectura positiva cuando el analito está ausente, proporcionando cualquier caso un resultado de ensayo engañoso.

Se ha sugerido un enfoque para la unión no específica de IgG a una fase sólida polimérica en un inmunoensayo de una muestra de suero. El enfoque implica la inclusión de un polímero soluble en agua en la fase líquida en la que se forma el polímero soluble en agua mediante la polimerización de monómeros que son iguales que, o que tienen aproximadamente la misma afinidad de unión inmunológica que, los monómeros del polímero en la superficie de la fase sólida. Los materiales empleados como polímero soluble en agua incluían poli(estireno-alt-ácido maleico) y poli(ácido acrílico), que demostraron superioridad con respecto a poli(ácido metacrílico) y dextrano y varios de otros materiales.

Sigue habiendo una necesidad de agentes para bloquear la unión no específica en ensayos que implican conjugados de polisacárido unidos a un soporte.

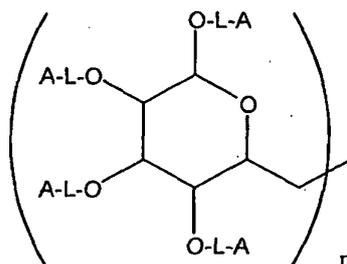
45 Sumario de la invención

Una realización de la presente invención es un método para reducir la unión no específica en un ensayo de unión para la determinación de un analito en una muestra en el que uno de los reactivos para realizar el ensayo de unión comprende un soporte sólido que comprende un polisacárido. El método comprende incluir en un medio de ensayo para realizar el ensayo de unión un compuesto soluble que comprende una proteína unida a un polisacárido.

Otra realización de la presente invención es un método para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito. Se proporciona una combinación que comprende la muestra, un compuesto soluble que comprende una proteína unida a un polisacárido, y reactivos para detectar el analito. Al menos uno de los reactivos para detectar el analito es un soporte que comprende un polisacárido. La combinación se incuba en condiciones para la unión del analito a uno o más de los reactivos. La presencia y/o la cantidad de unión del analito a uno o más de los reactivos se determinan cuando la presencia y/o la cantidad de la unión están relacionadas con la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra.

Otra realización de la presente invención es una composición que comprende un polisacárido unido a una proteína, en la que la unión entre el polisacárido y la proteína tiene sustancialmente la misma estructura que la unión usada para unir los miembros de par de unión específica a la superficie de un reactivo en fase sólida de un ensayo.

La proteína-polisacárido según la presente invención es un conjugado que comprende unidades de repetición de monosacárido y es de fórmula:



en la que uno de los A es un enlace con el carbono glicosídico C1 (tal como se indica en la fórmula anterior) de otra de las unidades, n es un número entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 50.000, los otros A se seleccionan independientemente del grupo que consiste en moléculas de proteína, hidrógeno, grupos que confieren solubilidad en agua o sustituyentes que reducen la cristalinidad, y L es un enlace o un grupo de unión, y la razón de moléculas de proteína con respecto a moléculas de monosacárido está en el intervalo de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:100.

En algunas realizaciones, cuando L es un grupo de unión y A es una proteína, L-A tiene la fórmula:



en la que m es un número entero de 0 a aproximadamente 5, R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo inferior y arilo, o R y R' pueden tomarse juntos para formar un doble enlace.

Descripción de las realizaciones específicas

Tal como se mencionó anteriormente, en un aspecto se proporciona un método para reducir la unión no específica en un ensayo de unión para la determinación de un analito en una muestra en el que uno de los reactivos para realizar el ensayo de unión comprende un soporte sólido que comprende un polisacárido. El método comprende incluir en un medio de ensayo para realizar el ensayo de unión un compuesto soluble que comprende una proteína unida a un polisacárido.

Unión no específica, en general, significa unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de estructuras de superficie específicas. La unión no específica se diferencia de la unión específica, que implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes por la otra en comparación con sustancialmente menos reconocimiento de otras moléculas. La unión no específica puede resultar de varios factores incluyendo interacciones hidrófobas entre moléculas, interacciones electrostáticas o de intercambio iónico entre moléculas, interacciones específicas de especie entre moléculas (por ejemplo, anticuerpo humano anti-ratón, anticuerpo de ratón anti-oveja, y similares), etc. La naturaleza de la molécula o moléculas que da(n) como resultado la unión no específica en ensayos depende de la naturaleza de la muestra, del medio de ensayo, de la superficie del reactivo en fase sólida, etc. En su mayor parte, las moléculas de unión no específica son materiales proteicos tales como, por ejemplo, inmunoglobulinas no específicas, inmunoglobulinas que tienen especificidad por moléculas distintas del analito del ensayo, proteínas de la cascada del complemento, proteínas de la cascada de coagulación y similares. La muestra puede ser tejido biológico, que incluye tejido extirpado de un órgano u otra parte del cuerpo de un huésped y fluidos corporales, por ejemplo, sangre completa, plasma, suero, orina, saliva, semen, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, mucosidad, y similares. En muchos casos, la muestra es plasma o suero.

El ensayo de unión implica generalmente la unión específica entre moléculas. Las moléculas pueden denominarse miembros de un par de unión específica ("sbp"), lo que significa una de dos moléculas diferentes, que tienen una zona sobre la superficie o en una cavidad, que se une específicamente a y que se define de ese modo como complementaria con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específica también pueden denominarse ligando y receptor (anti-ligando). Éstos serán habitualmente miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo, aunque otros pares de unión específica tales como biotina-avidina, hormonas-receptores de hormonas, dúplex de ácidos nucleicos, IgG-proteína A, pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN, y similares no son pares inmunológicos pero están incluidos en la definición de miembro de sbp. Los ensayos de unión se comentan en más detalle más adelante.

Los reactivos para realizar el ensayo de unión incluyen habitualmente uno o más miembros de sbp, que pueden unirse o no a otras moléculas dependiendo de la naturaleza de un ensayo particular en el que se emplean los reactivos. Pueden utilizarse uno o más pares de unión específica dependiendo de la naturaleza del ensayo. El miembro de sbp puede unirse o no a un soporte, un miembro de un sistema de producción de señales tal como una etiqueta, un miembro de sbp de un par de unión específica diferente, etc. Por consiguiente, los reactivos para realizar un ensayo pueden incluir miembros de sbp adicionales, reactivos auxiliares tales como un sustrato enzimático auxiliar, miembros del sistema de producción de señales, tampones, agentes de bloqueo para otras formas de unión no específica, etc. Los reactivos utilizados para realizar un ensayo de unión dependen de la

naturaleza del ensayo que va a realizarse y se comentan en detalle más adelante con respecto a diversas realizaciones de ensayo. Pueden emplearse uno o más reactivos particulares en un ensayo dependiendo de la naturaleza del ensayo.

- 5 Uno de los reactivos para realizar un ensayo de unión es un soporte que comprende un polisacárido, que es un hidrato de carbono que contiene tres o más unidades de monosacárido. El polisacárido puede ser de cadena lineal o ramificada. El peso molecular (en Dalton) del polisacárido es de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 5 millones o más, y en algunos casos de 10.000 a aproximadamente 1 millón o más, y en algunos casos de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 500.000, y en algunos casos de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 350.000.

10 Ejemplos de polisacáridos a modo de ilustración y no de limitación son dextrano, derivados de dextrano, ciclodextrina, derivados de celulosa, agarosa, gomas, almidón, glucógeno, polirribosa, amilosa, y similares. Un monosacárido es un hidrato de carbono que no puede hidrolizarse dando lugar a compuestos más sencillos tales como un aldehído-alcohol o una cetona-alcohol, por ejemplo, una hexosa o una pentosa. El dextrano es un polisacárido que consiste en unidades de glucosa lineales con uniones 1-6 (98%) y puede denominarse glucosa polimerizada. Los derivados de dextrano son dextrano modificado mediante reticulación, degradación, funcionalización, o similar, tal como, por ejemplo, modificación de uno o más grupos hidroxilo mediante la unión a otro resto o mediante modificación con un grupo funcional diferente tal como, por ejemplo, carboxilo, sulfato, sulfito, sulfona, amida, sulfonamida, halometilcarbonilo, epóxido, amino, aldehído, éster activo, maleimida, y similares. Cuando el polisacárido no es soluble en agua, la modificación puede incluir uno o más grupos o funcionalidades que confieren solubilidad en agua tal como se comenta más adelante.

15 La naturaleza del reactivo de polisacárido-soporte depende principalmente de la naturaleza del ensayo de unión. En muchos casos, el polisacárido no se une de manera difusiva a la superficie de un soporte. El polisacárido puede unirse de manera no difusiva a la superficie de un soporte o bien de manera covalente (mediante enlace directo con el polisacárido o mediante un grupo de unión) o bien de manera no covalente (mediante adsorción, precipitación (por ejemplo, agarosa), y similares) siempre que el polisacárido permanezca sustancialmente unido a la superficie en las condiciones de un ensayo o en otras condiciones a las que se someten los soportes. Se conocen en la técnica enfoques para recubrir una superficie de un soporte con un polisacárido. Por ejemplo, se comentan enfoques en Immunological Diagnostic Reagents, patente estadounidense n.º 4.264.766, Ernst A. Fischer, 28 de abril de 1981.

20 El soporte es generalmente una fase sólida, que es habitualmente un material insoluble en agua, poroso o no poroso que puede tener una cualquiera de varias formas, tales como tira, varilla, placa, pocillo, partícula o perla, etc. Se da a conocer una amplia variedad de soportes adecuados en Ullman, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.185.243, columnas 10-11.

25 La superficie puede ser hidrófila o que puede hacerse hidrófila e incluye polvos inorgánicos tales como sílice, sulfato de magnesio y alúmina; materiales poliméricos naturales, particularmente materiales celulósicos y materiales derivados de la celulosa, tales como papeles que contienen fibra, por ejemplo, papel de filtro, papel cromatográfico, papel de fibra de vidrio, etc.; polímeros que se producen de manera natural modificados o sintéticos, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), dextrano reticulado, agarosa, poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, poli(butirato de vinilo), etc.; usados o bien por sí mismos o bien conjuntamente con otros materiales; vidrio tal como, por ejemplo, vidrio disponible como Bioglass, materiales cerámicos, metales, y similares. También pueden emplearse conjuntos naturales o sintéticos tales como liposomas, vesículas de fosfolípidos y células. El soporte puede incluir partes moldeadas tales como, por ejemplo, pocillos de una placa de pocillos de microtitulación, paletas, esferas, etc.

30 Las partículas pueden ser de forma uniforme o no uniforme y pueden ser de tamaño microscópico o macroscópico. Las partículas pueden tener al menos aproximadamente 20 nm y no más de aproximadamente 20 micrómetros, y en algunos casos, al menos aproximadamente 40 nm y menos de aproximadamente 10 micrómetros, y en algunos casos desde aproximadamente 0,10 hasta 2,0 micrómetros de diámetro. La partícula puede tener cualquier densidad, pero preferiblemente una densidad que se aproxima a la del agua, generalmente desde aproximadamente 0,7 hasta aproximadamente 1,5 g/ml. Las partículas pueden tener o no una carga, y cuando están cargadas, son preferiblemente negativas. Las partículas pueden ser sólidas (por ejemplo, que se componen de polímeros orgánicos e inorgánicos o látex), gotitas de aceite (por ejemplo, fluido de silicio, hidrocarburo, fluorocarbono) o vesículas (por ejemplo, sintéticas tales como fosfolípidos o naturales tales como células y orgánulos).

35 Las partículas sólidas normalmente son polímeros, o bien polímeros de adición o bien de condensación, que son fácilmente dispersables en el medio de ensayo. Las partículas sólidas también tienen capacidad de adsorción o pueden funcionalizarse para unir o adherir en su superficie, o bien directa o bien indirectamente, un polisacárido, un conjugado polisacárido - miembro de sbp, o similar, y en algunos casos para incorporar dentro de su volumen un reactivo que puede reaccionar. Las partículas pueden ser no magnéticas o magnéticas.

40 Las partículas sólidas pueden componerse de poliestireno, poli(acrilamida), homopolímeros y copolímeros de

derivados de acrilato y metacrilato, particularmente ésteres y amidas, siliconas y similares. Las gotitas de aceite son partículas de fluido inmiscibles en agua que se componen de un compuesto lipófilo recubierto y estabilizado con un emulsionante que es una molécula anfífila tal como, por ejemplo, fosfolípidos, esfingomielina, albúmina y similares que existen como suspensión en una disolución acuosa, es decir una emulsión. Los liposomas son microvesículas que se componen de una o más bicapas lipídicas que tienen forma aproximadamente esférica y son uno de los materiales preferidos para su uso en la presente invención.

Las partículas de látex son un material polimérico insoluble en agua, que puede suspenderse en agua, particulado que tiene habitualmente dimensiones de partícula de 20 nm a aproximadamente 2000 nm, en algunos casos de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 nm de diámetro. El látex puede ser un polietileno sustituido tal como poliestireno-butadieno, poli(acrilamida), poliestireno, poliestireno con grupos amino, poli(ácido acrílico) sustituido, poli(ácido metacrílico) sustituido, acrilonitrilo-butadieno, copolímeros de estireno, poli(acrilato-acetato de vinilo), copolímeros de acrilato-cloruro de vinilo, y similares. Se prefieren polímeros no reticulados de estireno y estireno carboxilado o estireno funcionalizado con otros grupos activos tales como amino, hidroxilo, halo y similares. En algunos casos, se usarán copolímeros de estirenos sustituidos con dienos tales como butadieno.

Tal como se mencionó anteriormente, con el fin de reducir la unión no específica en un ensayo de unión para la determinación de un analito en una muestra en el que uno de los reactivos para realizar el ensayo de unión comprende un soporte sólido que comprende un polisacárido, en el medio de ensayo está presente un compuesto soluble que comprende una proteína unida a un polisacárido. El polisacárido del compuesto soluble puede seleccionarse de los polisacáridos mencionados anteriormente y puede ser igual que, o diferente de, el polisacárido sobre el soporte. Cuando los polisacáridos son diferentes, pueden diferir en que se derivan de diferentes derivados del mismo polisacárido o pueden diferir en que comprenden diferentes unidades de monosacárido en la cadena polimérica. Cuando son diferentes, el polisacárido del compuesto soluble puede diferir en que es similar en la estructura química pero de diferentes pesos moleculares. El peso molecular (en Dalton) del polisacárido del compuesto soluble debe ser de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.000.000, o de aproximadamente 40.000 a aproximadamente 500.000 o similar. En otras situaciones en las que los polisacáridos son diferentes, el polisacárido del conjugado soluble debe tener la característica de poder unirse al mismo sitio de unión del agente de unión de interferencia encontrado en las muestras discrepantes que se une al polisacárido sobre el soporte.

El conjugado polisacárido-proteína es soluble en el medio de ensayo en el que se emplea. La solubilidad del conjugado depende de la naturaleza del medio de ensayo, de la temperatura del medio de ensayo, de factores que determinan la presencia de reticulación del conjugado tal como el peso molecular de partida de la proteína y el polisacárido, así como la estequiometría del polisacárido y la proteína usados en la síntesis del conjugado, etc. En muchos casos, el medio de ensayo es un medio acuoso, habitualmente un medio tamponado acuoso. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir desde aproximadamente el 0,01 hasta aproximadamente el 80 por ciento en volumen, y en algunos casos, de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 40 por ciento en volumen, de un codisolvente. El codisolvente puede ser un hidrocarburo oxigenado tal como, por ejemplo, un alcohol, un éter, una amida, una cetona, y similares. Pueden emplearse alcoholes de alquilo inferior tales como, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, etc. El pH para el medio es generalmente un pH moderado y está en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5. El pH será habitualmente un compromiso entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específica, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo tales como miembros del sistema de producción de señales, etc.

Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el ensayo. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, Tris, barbital y similares. Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en el medio de ensayo. Por ejemplo, además de los tampones, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. En algunos casos, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; polianiones tales como sulfato de dextrano; tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos; potenciadores de la unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; o similares. Algunos aditivos, tales como algunos otros polímeros solubles en agua y algunas sales a alta concentración pueden volver los conjugados insolubles debido a incompatibilidad, por lo que se excluiría su uso con los conjugados polisacárido-proteína.

El límite de concentración práctico del conjugado polisacárido-proteína está determinado por la viscosidad de la disolución del conjugado en tampón, que a su vez resultará afectada por el peso molecular del conjugado. El límite de viscosidad práctico para conjugados de peso molecular de 10 millones está en el intervalo de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 5%.

En muchas realizaciones en las que el medio de ensayo es acuoso, el conjugado polisacárido-proteína es soluble en agua. El término "soluble en agua" se usa en el presente documento para referirse a libremente soluble en agua esencialmente en todas las proporciones así como en aquellas de solubilidad sólo limitada, es decir, limitada en la medida mencionada anteriormente. Pueden emplearse conjugados de solubilidad en agua limitada, según sea apropiado, a concentraciones por debajo de sus límites de solubilidad.

Si los componentes del conjugado ya no son solubles en agua de modo que el conjugado resultante es soluble en agua, uno o ambos de los componentes pueden funcionalizarse para conferir solubilidad en agua al conjugado mediante la incorporación de uno o más grupos o funcionalidades que confieren hidrofiliidad. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la sustitución apropiada, teniendo en cuenta el efecto deseado y/o los materiales que están fácilmente disponibles. En muchos casos, un grupo o una funcionalidad de este tipo es una funcionalidad hidrófila, que aumenta la humectabilidad de los sólidos con agua y la solubilidad en agua de los compuestos a los que se une. Tal grupo funcional o funcionalidad puede ser un sustituyente que tiene de 1 a 50 átomos o más y puede incluir un grupo que tiene un sulfonato, sulfato, fosfato, amidina, fosfonato, carboxilato, hidroxilo, particularmente polioles, amina, éter, amida, y similares. Grupos funcionales ilustrativos son carboxialquilo, sulfonoxialquilo, $\text{CONHOCH}_2\text{COOH}$, $\text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{COOH}$, SO_3H , $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, PO_3H_2 , OPO_3H_2 , hidroxilo, carbonilo, cetona, y combinaciones de los mismos. La mayoría de las funcionalidades anteriores también pueden utilizarse como grupos de unión, que permiten la unión del polisacárido a una proteína o viceversa.

Debe observarse que el polisacárido del compuesto soluble y el polisacárido sobre el soporte se denominan en ocasiones en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas el primer polisacárido y el segundo polisacárido. Esta designación se realiza para distinguir entre el polisacárido sobre el soporte y el polisacárido del compuesto soluble, que pueden ser diferentes. La designación es puramente arbitraria y no pretende expresar ningún orden de preferencia, adición o similar con respecto al/a los polisacárido(s) empleado(s).

El componente proteico del compuesto soluble puede ser cualquier proteína que, cuando forma parte del compuesto soluble y se usa tal como se comenta en el presente documento, dará como resultado una reducción de la unión no específica en un ensayo. La naturaleza de la proteína empleada depende de la naturaleza de la muestra que va a analizarse, del peso molecular de la proteína, de su reactividad química, de sus propiedades de solubilidad, etc. En la mayoría de los casos, la proteína del compuesto soluble es una que no interferirá con un ensayo para un analito. Por tanto, la proteína no debe ser un miembro de par de unión específica para ningún reactivo o analito de un ensayo ni ningún componente de una muestra que va a analizarse. La proteína puede ser de origen animal (incluyendo insecto, pescado, ave, etc.) o vegetal. Las proteínas animales adecuadas incluyen proteínas de sangre, suero, plasma, colágeno digerido, y similares. Las proteínas vegetales adecuadas incluyen globulina de semilla de calabaza, y similares. Las proteínas de la sangre incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, gammaglobulinas, tales como gamma-globulina de cabra, vaca, oveja y ratón; albúminas tales como albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana, ovoalbúmina, etc. Los ejemplos de otras proteínas incluyen caseína; gelatinas tales como hidrolizado enzimático de gelatina, gelatina de pescado y gelatina de piel de pescado; y similares.

En el conjugado, el número de moléculas de proteína por polisacárido depende de las concentraciones de las especies activadas durante la conjugación, del grado de activación de las especies, del tamaño y de la forma del derivado de polisacárido, del tamaño y la forma de la proteína, etc. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la sustitución apropiada, teniendo en cuenta el efecto deseado y/o los materiales que están fácilmente disponibles. La razón de moléculas de polisacárido con respecto a moléculas de proteína en el conjugado es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 1, de aproximadamente 4 a aproximadamente 1, de aproximadamente 3 a aproximadamente 1, de aproximadamente 2 a aproximadamente 1, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, etc. En general, la razón dependerá de la naturaleza del polisacárido tal como, por ejemplo, la composición química, el peso molecular, etc., y de la naturaleza de la proteína tal como, por ejemplo, la composición química, el peso molecular, etc., y en algunos casos puede determinarse empíricamente.

Pueden emplearse una amplia variedad de técnicas para unir el polisacárido y la proteína para formar el compuesto soluble. En un enfoque, se trata un polisacárido mediante métodos oxidativos conocidos (por ejemplo, activación con peryodato, perbromato, y similares) para producir una forma oxidativa en la que al menos una parte de las unidades monoméricas de sacárido se oxidan para presentar grupos aldehídos. Entonces, se hace reaccionar el polisacárido oxidado así formado con una proteína, que a través de los grupos amina primaria reacciona con los grupos aldehído del polisacárido oxidado y se une covalentemente al polisacárido a través de enlaces de base de Schiff. El tipo de reacción también se denomina aminación reductora.

Otro ejemplo implica un polisacárido derivatizado con amino o un polisacárido de carboximetilo, que reacciona con una proteína para formar un producto de amida. Por ejemplo, habitualmente se han utilizado aminodextrano o carboximetildextrano para formar conjugados con miembros de par de unión específica. El acoplamiento del dextrano con una proteína, por ejemplo, puede llevarse a cabo entonces a través de la formación de una amida.

Se describen una variedad de conjugados anticuerpo-aminodextrano en la patente estadounidense n.º 5.527.713 y la patente estadounidense n.º 5.658.741. Tales técnicas pueden emplearse para unir proteínas a polisacáridos en general. Recientemente, se describieron portadores poliméricos que contenían el resto de divinilsulfona para la unión covalente de la proteína y otras especies moleculares en la patente europea n.º 0 594 772 B1. El documento WO9907744 emplea reactivos que comprenden polisacáridos en los que los reactivos comprenden proteínas que se unen o bien al analito o bien a otros reactivos en un ensayo.

Puede prepararse aminodextrano mediante métodos descritos en la patente estadounidense n.º 5.466.609 y la patente estadounidense n.º 5.527.713, mediante oxidación con peryodato de dextrano, seguido por reacción con 1,3-propanodiamina. Naturalmente, el método particular de obtener los aminodextranos no se limita a tales técnicas y se prevé que cualquier técnica para obtener tales aminodextranos se encuentre dentro del conocimiento de los expertos en la técnica. Por ejemplo, un experto en la técnica puede sustituir fácilmente un diaminoalcano que tiene de dos a seis carbonos por 1,3-propanodiamina, descrito en los ejemplos. Preferiblemente, el aminodextrano es 5X-Amdex o 1X-Amdex, y lo más preferiblemente 5X-Amdex.

El grupo de unión puede ser una cadena de desde 1 hasta aproximadamente 30 o más átomos, desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 átomos, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 átomos, seleccionado cada uno independientemente del grupo que consiste normalmente en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo, habitualmente carbono y oxígeno. El número de heteroátomos en el grupo de unión normalmente oscila entre aproximadamente 0 y aproximadamente 8, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4. El número de átomos en la cadena se determina contando el número de átomos distintos de hidrógeno u otros átomos monovalentes a lo largo del camino más corto entre las estructuras que están conectadas. Los átomos del grupo de unión pueden sustituirse con átomos distintos de hidrógeno tales como carbono, oxígeno etc., en forma, por ejemplo, de alquilo, arilo, aralquilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, aralcoxilo, y similares. Como norma general, la longitud de un grupo de unión particular puede seleccionarse arbitrariamente para proporcionar conveniencia de síntesis con la condición de que se produzca una interferencia mínima provocada por el grupo de unión con la capacidad de que las moléculas unidas realicen su función relacionada con el ensayo en cuestión.

El grupo de unión puede ser alifático o aromático. Cuando están presentes heteroátomos, el oxígeno normalmente estará presente como oxi u oxo, unido a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo; el azufre estará presente como tioéter o tiono; el nitrógeno normalmente estará presente como nitro, nitroso o amino, normalmente unido a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el fósforo se unirá a carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, habitualmente como mono- o diéster de fosfato y fosfonato. Las funcionalidades presentes en el grupo de unión pueden incluir ésteres, tioésteres, amidas, tioamidas, éteres, ureas, tioureas, guanidinas, grupos azo, tioéteres, carboxilato, etc.

Se encuentran ejemplos, a modo de ilustración y no de limitación, de diversos grupos de unión que encuentran uso en la presente invención en la patente estadounidense n.º 3.817,837, particularmente en de la columna 30, línea 69, a la columna 36, línea 10. Se dan a conocer diversos grupos de unión y funcionalidades de unión en Cautrecasas, J. Biol. Chem. (1970) 245:3059. Se dan a conocer ejemplos de reactivos de reticulación disponibles comercialmente en el Pierce Catalog and Handbook, Life Science and Analytical Research Products, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., 1994/1995.

Los compuestos según la invención pueden purificarse con métodos convencionales, por ejemplo, cromatografía, filtración incluyendo microfiltración, ultrafiltración, diafiltración, etc., precipitación, diálisis y similares.

El conjugado proteína-polisacárido soluble habitualmente porta una carga neutra o una carga negativa. Si la carga del conjugado proteína-polisacárido soluble no es neutra, es deseable que el compuesto soluble tenga la misma carga que el reactivo de soporte que comprende un polisacárido. El reactivo de soporte que comprende un polisacárido habitualmente tiene una carga negativa y, por tanto, el conjugado proteína-polisacárido soluble debe tener una carga negativa o neutra.

Uno o más de los reactivos para realizar un ensayo, distintos del compuesto soluble o un soporte que comprende un polisacárido, pueden incluir un reactivo de soporte adicional, que puede comprender o no un polisacárido. Si el reactivo de soporte adicional comprende un polisacárido, el polisacárido puede ser igual que o diferente del polisacárido del otro reactivo de soporte o del compuesto soluble. Por ejemplo, pueden emplearse dos o más conjuntos de reactivos de partículas en un ensayo dependiendo del formato del ensayo. Uno o más de los reactivos de partículas pueden comprender un polisacárido. Un reactivo de partículas puede recubrirse con un polisacárido, que se une a un miembro de sbp de un par de unión específica, y otro reactivo de partículas puede recubrirse con un polisacárido, que se une a otro miembro de sbp de un par de unión específica diferente. Debe resultar obvio para un experto en la técnica que son posibles numerosos formatos de ensayo en los que puede emplearse un conjugado proteína-polisacárido soluble para evitar la unión no específica en un ensayo.

Habitualmente es deseable que el comportamiento de unión por afinidad del compuesto soluble sea mejor que el comportamiento de unión por afinidad del polisacárido en el soporte. La expresión "comportamiento de unión por afinidad" se refiere a la fuerza de afinidad y la especificidad en los tipos de interacciones que normalmente constituyen unión inmunológica o por afinidad tal como, por ejemplo, la unión de tipo antígeno-anticuerpo. En algunas realizaciones, el comportamiento de unión por afinidad del compuesto soluble es mejor que el comportamiento de unión por afinidad del polisacárido sobre el soporte en al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces,

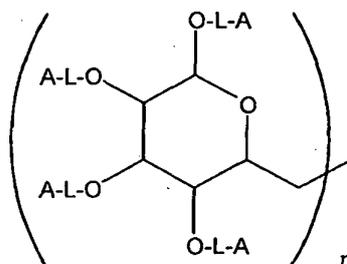
al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 300 veces, o más.

La cantidad de compuesto proteína-polisacárido soluble empleado es habitualmente una cantidad suficiente para reducir significativamente o eliminar la interferencia de la unión no específica en el ensayo de unión específica. Una reducción significativa de interferencia de la unión no específica se logra cuando la respuesta de un ensayo es mayor que la lograda en ausencia del conjugado proteína-polisacárido soluble y esté o no en presencia de componentes del conjugado separados del conjugado tal como proteína sola o polisacárido solo o una combinación de proteína separada y polisacárido separado y estén presentes o no otros materiales para reducir la interferencia. La cantidad de compuesto soluble usado en cualquier ensayo particular se determina habitualmente de manera empírica. Habitualmente, el compuesto soluble se emplea en una cantidad en exceso. La cantidad de compuesto soluble puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/ml, en algunos casos de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 mg/ml, en el medio de ensayo. Sin embargo, las cantidades anteriores son a modo de ilustración y no de limitación. Pueden emplearse cantidades fuera de los intervalos anteriores en determinadas circunstancias siempre que la cantidad sea suficiente para reducir significativamente o eliminar la interferencia de la unión no específica en el ensayo de unión específica.

Los conjugados proteína-polisacárido

A continuación se comentan a modo de ilustración y no de limitación, realizaciones específicas de compuestos solubles a modo de ejemplo.

Los conjugados proteína-polisacárido comprenden unidades de repetición de monosacárido y son de fórmula:



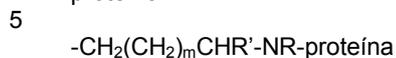
en la que uno de los A es un enlace con el carbono glicosídico C1 (tal como se indica en la fórmula anterior) de otra de las unidades, n es un número entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 50.000, o de aproximadamente 25 a aproximadamente 10.000, o de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.000, L es un enlace o un grupo de unión tal como se definió anteriormente y los otros A se seleccionan independientemente del grupo que consiste en moléculas de proteína, hidrógeno, grupos que confieren solubilidad en agua o sustituyentes que reducen la cristalinidad.

El término "sustituyentes que reducen la cristalinidad" se refiere a grupos o funcionalidades que reducen o eliminan la cristalinidad de la estructura principal original del polisacárido aumentando así la solubilidad del polisacárido o el conjugado posterior. Los sustituyentes que reducen la cristalinidad incluyen, por ejemplo, sustituyentes de carboximetilo (por ejemplo, en celulosa y similares), metilo, hidroxietilo, y similares.

El número de A que son moléculas de proteína depende de factores tales como el tamaño de la molécula de proteína, etc. En algunas realizaciones, la razón de moléculas de proteína con respecto a moléculas de monosacárido está en el intervalo de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:100, o de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:95, o de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:90, o de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:85, o de aproximadamente 1:6 a aproximadamente 1:80, o de aproximadamente 1:7 a aproximadamente 1:75, o de aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:70, o de aproximadamente 1:9 a aproximadamente 1:65, o de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:60, o de aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:55, o de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:50, o de aproximadamente 1:25 a aproximadamente 1:45, o de aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:40. En algunas realizaciones, uno de los A es una molécula de proteína por al menos cada dos moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada tres moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada cuatro moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada cinco moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada seis moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada siete moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada ocho moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada nueve moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada diez moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada quince moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada veinte moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada veinticinco moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada treinta moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada treinta y cinco moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada cuarenta moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada cuarenta y cinco moléculas de monosacárido, por al menos aproximadamente cada

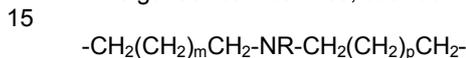
cincuenta moléculas de monosacárido, etc.

En algunas realizaciones, cuando A es una proteína, L es un grupo de unión de fórmula, que incluye el resto de proteína:



10 en la que R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo inferior, arilo, y similares o R y R' pueden tomarse juntos para formar un doble enlace entre CH y N (es decir, $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_m\text{CH=N-}$) y en la que m es un número entero de 0 a aproximadamente 5, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2, y en la que el nitrógeno es de un aminoácido de la proteína.

En algunas realizaciones, cuando A es una proteína, L es un grupo de unión de fórmula:



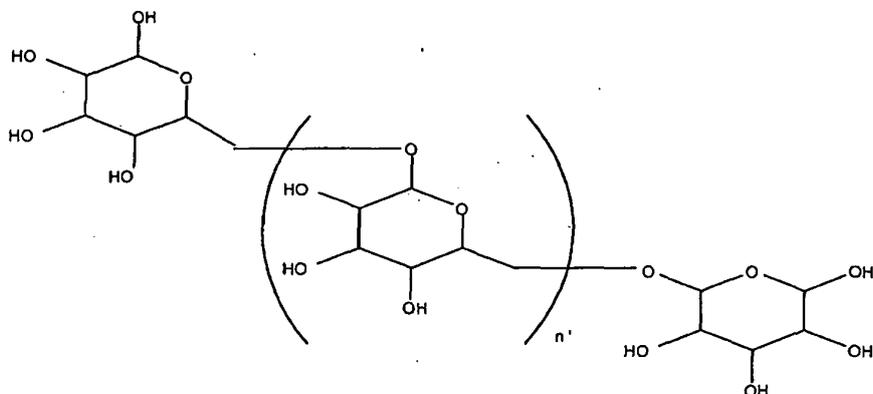
20 en la que m y p son independientemente números enteros de 0 a aproximadamente 5, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2, y R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo inferior, arilo, y similares. En algunas realizaciones, el grupo de unión L se forma por la reacción de un grupo de unión en el polisacárido que comprende un grupo aldehído terminal y un grupo nitrógeno de la molécula de proteína tal como, por ejemplo, un grupo nitrógeno de un residuo de aminoácido de la molécula de proteína. Por consiguiente, la parte de $-\text{NR-CH}_2(\text{CH}_2)_p\text{CH}_2\text{-}$ del grupo de unión anterior puede proceder de un residuo de aminoácido de la proteína tal como, por ejemplo, una lisina (en el que el grupo de unión comprende $-\text{NR-CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{NH-}$ y el conjugado de polisacárido es polisacárido- $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{-NRCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{NH-proteína}$, y similares. En algunas realizaciones, las moléculas de proteína se seleccionan del grupo que consiste en albúminas y gamma-globulinas.

30 En algunas realizaciones, cuando A es una proteína, L es un grupo de unión de fórmula:

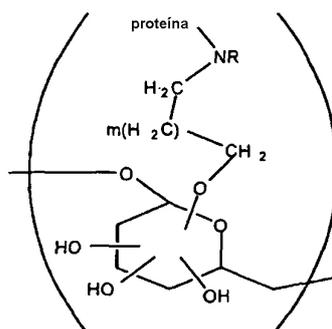


35 en la que m y p son independientemente números enteros de 0 a aproximadamente 5, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 y R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo inferior, arilo, y similares. En algunas realizaciones, el grupo de unión L se forma por la reacción de un grupo de unión en el polisacárido que comprende un grupo aldehído terminal y un grupo nitrógeno de la molécula de proteína tal como, por ejemplo, un grupo nitrógeno de un residuo de aminoácido de la molécula de proteína. Por consiguiente, la parte de $-\text{NR-CHR}'(\text{CH}_2)_p\text{CO-}$ del grupo de unión anterior puede proceder de un residuo de aminoácido de la proteína tal como, por ejemplo, el aminoácido N-terminal de la proteína, y similares. En algunas realizaciones, las moléculas de proteína se seleccionan del grupo que consiste en albúminas y gamma-globulinas.

45 En algunas realizaciones los conjugados proteína-polisacárido son conjugados proteína-dextrano de fórmula:



50 en la que una o más de las n' unidades de monosacárido tienen la fórmula:

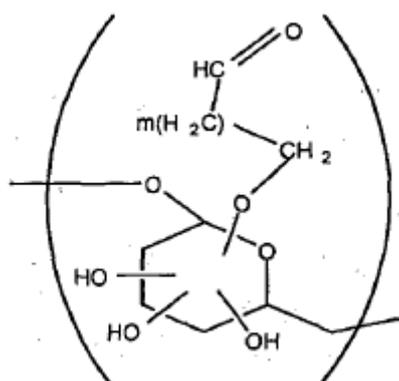


monosacárido sustituido con proteína

5 y en la que n' es un número entero de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 60.000, m se define como anteriormente, R se define como anteriormente, la proteína es, por ejemplo, una gamma-globulina o una albúmina, y en la que la proteína $-NR$ -proteína puede ser $-NR-CH_2(CH_2)_pCH_2$ -proteína en la que p se define como anteriormente y en la que la parte de $-NR-CH_2(CH_2)_pCH_2$ - del grupo de unión anterior puede proceder de un residuo de aminoácido de la proteína tal como, por ejemplo, una lisina, y similares, o en la que la $-NR$ -proteína puede ser $-NR-CHR'(CH_2)_pCO$ -proteína, en la que la parte de $-NR-CHR'(CH_2)_pCO$ - del grupo de unión anterior puede proceder de un residuo de aminoácido de la proteína tal como, por ejemplo, el aminoácido N-terminal de la proteína, y similares. El número de unidades de monosacárido sustituido por proteína es de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 para n' de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 60.000 (que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 10 millones), y similares, a modo de ejemplo y no de limitación.

15 En una realización específica de lo anterior, m es 4, la $-NR$ -proteína es $-NR-CH_2(CH_2)_pCH_2$ -proteína en la que p es 2. En otra realización específica de lo anterior, $-NR$ -proteína es $-NR-CH_2(CH_2)_2CH_2-C(COOH)NH$ -proteína.

20 Los conjugados proteína-dextrano anteriores pueden sintetizarse a partir del correspondiente dextranaldehído, que reacciona con un grupo amino en la proteína tal como, por ejemplo, un grupo amino de un aminoácido N-terminal, por ejemplo, una lisina, de la proteína



+ proteína-NH₂

25 parte de dextranaldehído del polisacárido anterior

30 En un enfoque a modo de ejemplo para la síntesis de dextranaldehído a modo de ilustración y no de limitación, se combina dextrano en un medio acuoso en condiciones básicas con un dioxolano apropiado tal como, por ejemplo, 2-(4-halobutil)-1,3-dioxolano en el que halo es cloro, bromo o yodo. Pueden lograrse condiciones básicas mediante la inclusión en el medio acuoso de una base tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o similares. El pH del medio básico es mayor de aproximadamente 14. La reacción se lleva a cabo a temperatura elevada de aproximadamente 30°C a aproximadamente 100°C, o de aproximadamente 50°C a aproximadamente 90°C durante un periodo de tiempo de aproximadamente 6 a aproximadamente 48 horas, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas. Entonces, se añade agua y se enfría la mezcla hasta temperatura ambiente. Se ajusta el pH hasta de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 6,5, mediante la adición de un ácido tal como, por ejemplo, un ácido mineral, por ejemplo, ácido clorhídrico, y similares, o un ácido orgánico, por ejemplo, ácido acético, y similares. El producto de dextranaldehído resultante puede someterse a diversas técnicas para su aislamiento y purificación tal como se comentó anteriormente.

40 Entonces, se hace reaccionar el dextranaldehído con una amina de la proteína. Generalmente, esta reacción se lleva a cabo en condiciones levemente ácidas en presencia de un agente reductor I como cianoborohidruro o

similares. El pH del medio de reacción que contiene el reactante debe ser suficientemente bajo como para permitir que un número apreciable de los grupos amina se protone, pero no tan bajo que dé como resultado una cantidad insuficiente de compuestos de amina libre. El pH es habitualmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5, o de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6. El periodo de tiempo para la reacción es habitualmente de aproximadamente 10 a 20 horas, preferiblemente, de aproximadamente 14 a 18. La temperatura de la mezcla de reacción es generalmente de aproximadamente 15 a 30°C, habitualmente de aproximadamente 20 a 25°C.

A menudo es deseable extinguir cualquier funcionalidad aldehído que no haya reaccionado con el polipéptido. Para este fin, el conjugado producido anteriormente se trata con un agente de extinción adecuado que formará un producto estable con los grupos aldehído libres restantes. Un agente de extinción de este tipo puede ser, por ejemplo, hidroxilamina, semicarbazida, fenilhidrazina, hidrazina, cianuro de sodio, carboximetoxiamina, y similares. El producto resultante se purifica mediante medios convencionales tales como, por ejemplo, ultrafiltración, precipitación, diálisis, etc.

Otros enfoques para preparar los conjugados anteriores incluyen los siguientes:

En un enfoque, se hace reaccionar el polisacárido con un agente alquilante adecuado tal como, por ejemplo, epíclorohidrina o divinilsulfona, para introducir funcionalidad reactiva con amina de epóxido o vinilsulfona.

En otro enfoque, una funcionalidad reactiva con amina de este tipo puede introducirse a través de la oxidación del polisacárido con peryodato para generar grupos aldehídos que son reactivos con amina.

En algunos casos puede ser deseable formar el conjugado proteína-polisacárido *in situ*. Esto puede llevarse a cabo, en el caso del dextrano, por ejemplo, añadiendo dextranaldehído a un medio que contiene la proteína. Un medio de este tipo puede ser, por ejemplo, una muestra de suero que ha de analizarse. La proteína para formar el conjugado puede estar presente en la muestra de suero o puede añadirse antes de añadir el dextranaldehído. El conjugado proteína-polisacárido soluble formado *in situ* puede utilizarse cuando puede tolerarse un bloqueo algo inferior de interferencia de muestra en un ensayo. Por lo general, los conjugados proteína-polisacárido solubles formados como una entidad separada y luego añadidos a la muestra para analizarse proporcionan mejor protección frente a sustancias de interferencia y se utilizan mejor para muestras que suponen más complicación con respecto a la protección frente a tales sustancias de interferencia.

Tal como se mencionó anteriormente, otra realización de la invención es una composición que comprende un polisacárido unido a una proteína, en la que la unión entre el polisacárido y la proteína tiene sustancialmente la misma estructura que la unión usada para unir un miembro de par de unión específica a un polisacárido sobre la superficie de un reactivo en fase sólida de un ensayo. Según esta realización, la unión tiene sustancialmente la misma estructura si la estructura química de la unión es sustancialmente igual.

Esta unión puede ser un enlace o un grupo de unión tal como se comentó anteriormente. El grupo de unión es sustancialmente igual, por ejemplo, cuando hay una relación homóloga entre los grupos de unión donde la diferencia debida a homología es de no más de 3 átomos de carbono, no más de 2 átomos de carbono, no más de 1 carbono átomo. Si el grupo de unión comprende uno o más grupos funcionales, los grupos de unión son sustancialmente iguales cuando los grupos funcionales de un grupo de unión son iguales que los grupos funcionales del otro grupo de unión.

Ejemplos de ensayos que emplean los compuestos solubles en agua

Tal como se mencionó anteriormente, los compuestos o conjugados proteína-polisacárido solubles comentados anteriormente pueden utilizarse en ensayos de unión para analitos. Los métodos de ensayo habitualmente implican una muestra que se sospecha que contiene un analito, que se combina en un medio de ensayo con reactivos para llevar a cabo el ensayo. Tales reactivos incluyen un soporte o fase sólida que comprende un polisacárido y que puede comprender además un miembro de sbp. Otros reactivos de ensayo pueden incluir una pareja de unión para el analito si el miembro de sbp sobre el soporte sólido no es una pareja de unión para el analito, análogos de analito, otros soportes sólidos a los que se une uno de los reactivos anteriores, parejas de unión para miembros de sbp, etc. Uno o más de los reactivos pueden formar parte de un sistema de producción de señales en el que puede marcarse al menos uno de los reactivos. Los reactivos se eligen de manera que se obtiene una señal de una etiqueta en relación con la presencia o la cantidad de analito en la muestra. El ensayo puede realizarse o bien sin separación (homogéneo) o bien con separación (heterogéneo) de cualquier compuesto o producto del ensayo. Puesto que se utilizan soportes sólidos, el ensayo es habitualmente heterogéneo aunque se conocen formatos homogéneos que usan tales reactivos.

Los ensayos heterogéneos habitualmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Se dan a conocer una variedad de formatos de ensayo heterogéneos competitivos y no competitivos en Davalian, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.089.390, de la columna 14, línea 25 a la columna 15, línea 9. En un ensayo heterogéneo competitivo típico se pone en contacto un soporte que tiene un anticuerpo para un analito unido

al mismo por medio de un polisacárido con un medio que contiene la muestra y el análogo de analito conjugado con una etiqueta detectable tal como una enzima (el "conjugado"). El analito en la muestra compete con el conjugado por unirse al anticuerpo. Tras separar el soporte y el medio, se determina la actividad de la etiqueta del soporte o el medio mediante técnicas convencionales y se relaciona con la cantidad de analito en la muestra.

5 Un ensayo de tipo sándwich no competitivo típico es un ensayo dado a conocer en David, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.486.530, de la columna 8, línea 6 a la columna 15, línea 63. En este método, se forma un complejo de tipo sándwich inmunitario en un medio de ensayo. El complejo comprende el analito, un primer anticuerpo (monoclonal o policlonal) que se une al analito y un segundo anticuerpo que se une al analito o a un complejo del analito y el primer anticuerpo. Posteriormente, se detecta el complejo de tipo sándwich inmunitario y se relaciona con la cantidad de analito en la muestra. El complejo de tipo sándwich inmunitario se detecta en virtud de la presencia en el complejo de una etiqueta en la que cualquiera de o tanto el primer anticuerpo como el segundo anticuerpo contienen etiquetas o sustituyentes que pueden combinarse con etiquetas.

15 Los ensayos de tipo sándwich encuentran uso por lo general en la detección de analitos receptores y antígeno. En el ensayo, el analito se une mediante dos anticuerpos específicos para el analito y, por tanto, el ensayo también se denomina el ensayo inmunométrico de dos sitios. En un enfoque, se pone en contacto una primera incubación de anticuerpo no marcado acoplado a un soporte, conocido por lo demás como el anticuerpo insolubilizado, con un medio que contiene una muestra que se sospecha que contiene el analito. Tras una etapa de lavado y separación, se pone en contacto el soporte con un medio que contiene el segundo anticuerpo, que generalmente contiene una etiqueta, durante un segundo periodo de incubación. El soporte se lava de nuevo y se separa del medio y se examina cualquiera del medio o el soporte para determinar la presencia de la etiqueta. La presencia y la cantidad de etiqueta están relacionadas con la presencia o la cantidad del analito. Para una discusión más detallada de este enfoque, véanse las patentes estadounidenses n.ºs Re 29.169 y 4.474.878.

25 En una variación del ensayo de tipo sándwich anterior, se pone en contacto la muestra en un medio adecuado con el anticuerpo marcado para el analito y se incuba durante un periodo de tiempo. Entonces, se pone en contacto el medio con un soporte al que se une un segundo anticuerpo para el analito. Tras un periodo de incubación, se separa el soporte del medio y se lava para eliminar los reactivos no unidos. Se examina el soporte o el medio para determinar la presencia de la etiqueta, que está relacionada con la presencia o la cantidad de analito. Para una discusión más detallada de este enfoque, véase la patente estadounidense n.º 4.098.876.

35 En otra variación de lo anterior, se combinan la muestra, el primer anticuerpo unido a un soporte y el anticuerpo marcado en un medio y se incuban en una sola etapa de incubación. Las etapas de separación, lavado y el examen para determinar etiquetas son igual que anteriormente. Para una discusión más detallada de este enfoque, véase la patente estadounidense n.º 4.244.940.

40 Los conjugados proteína-polisacárido solubles tienen aplicación para todos los ensayos anteriores. A continuación se describe un ejemplo particular de un ensayo a modo de ilustración y no de limitación. Un ensayo de este tipo se denomina un inmunoensayo de luminiscencia inducida y se describe en la patente estadounidense n.º 5.340.716 (Ullman, *et al.*) titulada "Assay Method Utilizing Photoactivated Chemiluminescent Label" ("ensayo de luminiscencia inducida"). En un enfoque, el ensayo usa una partícula que incorpora un fotosensibilizador y una partícula de etiqueta que incorpora un compuesto quimioluminiscente. La partícula de etiqueta se conjuga con un miembro de sbp que puede unirse a un analito para formar un complejo, o a un segundo miembro de sbp para formar un complejo, en relación con la presencia del analito. Si está presente el analito, en fotosensibilizador y el compuesto quimioluminiscente entran en estrecha proximidad. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente cuando las dos etiquetas están en estrecha proximidad. El compuesto quimioluminiscente activado produce posteriormente luz. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad de complejo formado, que a su vez está relacionada con la cantidad de analito presente.

50 A modo de ilustración adicional, se emplea una partícula quimioluminiscente, que comprende el compuesto quimioluminiscente asociado con ella tal como mediante la incorporación en el mismo o la unión al mismo. Se une un miembro de sbp que se une al analito a un polisacárido que recubre estas partículas. Un segundo miembro de sbp que se une al analito forma parte de un conjugado de biotina. Se conjuga estreptavidina con un segundo conjunto de partículas que tienen un fotosensibilizador asociado con ellas. La unión de la estreptavidina con este segundo conjunto de partículas (partículas de fotosensibilizador) puede implicar o no un polisacárido sobre las partículas. Se combinan las partículas quimioluminiscentes con un conjugado proteína-polisacárido tal como se comentó anteriormente y se mezcla esta combinación con una muestra que se sospecha que contiene un analito y las partículas de fotosensibilizador. Se incuban el medio de reacción para permitir que las partículas se unan al analito en virtud de la unión de los miembros de sbp al analito. Entonces, se irradia el medio con luz para excitar el fotosensibilizador, que en su estado excitado puede activar oxígeno hasta un estado de singlete. Puesto que el compuesto quimioluminiscente de uno de los conjuntos de partículas está ahora en estrecha proximidad con el fotosensibilizador en virtud de la presencia del analito, se activa mediante el oxígeno singlete y emite luminiscencia. Entonces se examina el medio para determinar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, cuya la presencia está relacionada con la presencia del analito.

Otro ejemplo particular de un ensayo en el que tienen aplicación los presentes conjugados solubles se comenta en la patente estadounidense n.º 5.616.719 (Davalian, *et al.*), que describe un inmunoensayo fluorescente de canalización de oxígeno.

5 En general, pueden emplearse temperaturas de moderadas a relativamente altas para llevar a cabo el ensayo. Las temperaturas pueden ser constantes o variables dependiendo del tipo de ensayo realizado y de los reactivos utilizados. Las temperaturas de incubación normalmente oscilarán entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100°C, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 95°C. Las temperaturas durante las mediciones generalmente oscilarán entre 5 y aproximadamente 100°C, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 95°C.

10 La concentración de analito que puede someterse a ensayo generalmente variará desde aproximadamente 10^{-2} hasta aproximadamente 10^{-15} M, desde aproximadamente 10^{-5} hasta aproximadamente 10^{-12} M. Consideraciones tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (en relación con la cantidad de analito presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración del analito, y la optimización de la unión entre los materiales de unión específica, normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

15 Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo se determinan generalmente mediante el intervalo de concentración de interés del analito. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo a lo largo del intervalo. Es decir, una variación en la concentración de analito que es importante debe proporcionar una diferencia de señal que puede medirse de manera precisa.

20 Aunque las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente se determinarán mediante el intervalo de concentración de interés del analito que va a detectarse, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determinará empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo a lo largo del intervalo. Es decir, una variación en la concentración de los componentes que van a detectarse que es importante debe proporcionar una diferencia de señal que puede medirse de manera precisa.

25 Aunque el orden de adición puede variarse ampliamente, habrá determinadas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden de adición más sencillo es añadir todos los materiales simultáneamente. Cuando no son simultáneos, en algunas realizaciones la muestra y el compuesto soluble se mezclan entre sí antes de formar una combinación con otros reactivos de ensayo. En algunas realizaciones, el compuesto soluble y el soporte sólido se mezclan entre sí antes de formar una combinación con los otros reactivos de ensayo.

30 Pueden combinarse otros reactivos de ensayo de manera total o parcialmente secuencial. Pueden incluirse una o más etapas de incubación una vez combinados los reactivos, oscilando generalmente entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 72 horas, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 30 segundos a 6 horas, de aproximadamente 2 minutos a 1 hora.

40 Análisis de términos

Antes de proseguir con la descripción de ejemplos de realizaciones específica de los materiales y métodos mencionados anteriormente, se definirán varios términos empleados anteriormente.

45 Alquilo - un radical monovalente ramificado o no ramificado derivado de un hidrocarburo alifático mediante la eliminación de un átomo de H; incluye tanto alquilo inferior como alquilo superior.

Alquilo inferior - alquilo que contiene desde 1 hasta 5 átomos de carbono tal como, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, isobutilo, pentilo, isopentilo, etc.

50 Alquilo superior - alquilo que contiene más de 6 átomos de carbono, habitualmente de 6 a 20 átomos de carbono, tal como, por ejemplo, hexilo, heptilo, octilo, etc.

Alquilideno - un radical orgánico divalente derivado de un hidrocarburo alifático, tal como, por ejemplo, etilideno, en el que se extraen 2 átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono.

60 Arilo - un radical orgánico derivado de un hidrocarburo aromático mediante la eliminación de un átomo y que contiene uno o más anillos aromáticos, habitualmente de uno a cuatro anillos aromáticos, tal como, por ejemplo, fenilo (a partir del benceno), naftilo (a partir del naftaleno), etc., por ejemplo, fenilo, naftilo, fenantrilo.

Aralquilo - un radical orgánico que tiene un grupo alquilo al que se le une un grupo arilo, por ejemplo, bencilo, fenetilo, 3-fenilpropilo, 1-naftiletilo, etc.

65 Alcoxilo - un radical alquilo unido a la parte restante de una molécula mediante un átomo de oxígeno, por ejemplo, metoxilo, etoxilo, etc.

Ariloxilo - un radical arilo unido a la parte restante de una molécula mediante un átomo de oxígeno, por ejemplo, fenoxilo, naftoxilo, etc., por ejemplo, m-metoxifenilo.

5 Aralcoxilo - un radical aralquilo unido a la parte restante de una molécula mediante un átomo de oxígeno, por ejemplo, benzoxilo, 1-naftiletoxilo, etc.

Funcionalidad reactiva con amina - una funcionalidad reactiva con una funcionalidad amina, habitualmente en virtud de la nucleofilicidad o basicidad de la amina, tal como, por ejemplo, un aldehído, un ácido α -cetocarboxílico y similares.

10 Agente alquilante que tiene una funcionalidad que reacciona con un grupo hidroxilo - un compuesto que tiene una funcionalidad reactiva con un grupo hidroxilo, habitualmente en virtud de la nucleofilicidad del grupo hidroxilo neutro o ionizado, tal como, por ejemplo, un radical oxiranilo, un radical alquilo que comprende un grupo saliente tal como, por ejemplo, haluro (bromuro, cloruro, yoduro); arilsulfonatos; alquilsulfonatos; arilsulfatos; alquilsulfatos; tosilatos; derivados del ácido acrílico tales como acrilamida; vinilsulfonas; y similares.

Conjugado - una molécula que se compone de dos o más subestructuras unidas entre sí, generalmente a través de un grupo de unión, para formar una única estructura.

20 Analito - el compuesto o la composición que va a detectarse. El analito puede componerse de un miembro de un par de unión específica (sbp) y puede ser un ligando, que es habitualmente monovalente (monoepitópico), habitualmente hapténico, y es un único compuesto o pluralidad de compuestos que comparten al menos un sitio epitópico o determinante común.

25 Los analitos de ligando monoepitópico tendrán generalmente un peso molecular de desde aproximadamente 100 hasta 2.000, más habitualmente un peso molecular de desde 125 hasta 1.000. Los analitos incluyen fármacos, metabolitos, pesticidas, contaminantes, y similares. Los analitos representativos, a modo de ejemplo y no de limitación, incluyen (i) alcaloides tales como alcaloides de la morfina, que incluyen morfina, codeína, heroína, dextrometorfano, sus derivados y metabolitos; alcaloides de la cocaína, que incluyen cocaína y bencilecgonina, sus derivados y metabolitos; alcaloides del cornezuelo del centeno, que incluyen la dietilamida del ácido lisérgico; alcaloides de esteroides; alcaloides de iminazoilo; alcaloides de quinazolina; alcaloides de isoquinolina; alcaloides de quinolina, que incluyen quinina y quinidina; alcaloides diterpénicos, sus derivados y metabolitos; (ii) esteroides, que incluyen los estrógenos, andrógenos, esteroides adrenocorticales, ácidos biliares, glicósidos cardiotónicos y agliconas, que incluyen digoxina y digoxigenina, saponinas y sapogeninas, sus derivados y metabolitos; sustancias miméticas de esteroides, tales como dietilestilbestrol; (iii) lactamas que tienen desde 5 hasta 6 miembros de anillo, que incluyen los barbitúricos, por ejemplo, fenobarbital y secobarbital, difenilhidantoína, primidona, etosuximida, y sus metabolitos; (iv) aminoalquilbencenos, con alquilo de desde 2 hasta 3 átomos de carbono, que incluyen las anfetaminas; catecolaminas, que incluyen efedrina, L-dopa, epinefrina; narceína; papaverina; y metabolitos de los anteriores; (v) benzoheterociclos que incluyen oxazepam, clorpromazina, tegretol, sus derivados y metabolitos, siendo los anillos heterocíclicos azepinas, diazepinas y fenotiazinas; (vi) purinas, que incluyen teofilina, cafeína, sus metabolitos y derivados; (vii) fármacos derivados de la marihuana, que incluyen cannabinoles y tetrahidrocannabinol; (viii) hormonas tales como tiroxina, cortisol, triyodotironina, testosterona, estradiol, estrona, progesterona, polipéptidos tales como angiotensina, LHRH, e inmunosupresores tales como ciclosporina, FK506, ácido micofenólico (MPA), etc.; (ix) vitaminas tales como A, B, por ejemplo B12, C, D, E y K, ácido fólico, tiamina; (x) prostaglandinas, que difieren en el grado y los sitios de hidroxilación e insaturación; (xi) antidepresivos tricíclicos, que incluyen imipramina, desmetilimipramina, amitriptilina, nortriptilina, protriptilina, trimipramina, clomipramina, doxepina y desmetilodoxepina; (xii) antineoplásicos, que incluyen metotrexato; (xiii) antibióticos, que incluyen penicilina, cloromicetina, actinomicetina, tetraciclina, terramicina, los metabolitos y derivados; (xiv) nucleósidos y nucleótidos, que incluyen ATP, NAD, FMN, adenosina, guanosina, timidina y citidina con sus sustituyentes de azúcar y fosfato apropiados; (xv) fármacos individuales variados que incluyen metadona, meprobamato, serotonina, meperidina, lidocaína, procainamida, acetilprocainamida, propranolol, griseofulvina, ácido valproico, butirofenonas, antihistamínicos, cloranfenicol, fármacos anticolinérgicos, tales como atropina, sus metabolitos y derivados; (xvi) metabolitos relacionados con estados patológicos que incluyen espermina, galactosa, ácido fenilpirúvico y porfirina tipo 1; (xvii) aminoglicósidos, tales como gentamicina, kanamicina, tobramicina y amikacina; y (xviii) pesticidas tales como bifenilos polihalogenados, ésteres de fosfato, tiofosfatos, carbamatos, sulfenamidas polihalogenadas, sus metabolitos y derivados.

60 Los analitos polivalentes son normalmente poli(aminoácidos), es decir, polipéptidos y proteínas, polisacáridos; ácidos nucleicos, y combinaciones de los mismos. Tales combinaciones incluyen componentes de bacterias, virus, cromosomas, genes, mitocondrias, núcleos, membranas celulares y similares. En su mayor parte, los analitos de ligando poliepitópico tendrán un peso molecular de al menos aproximadamente 5.000, más habitualmente de al menos aproximadamente 10.000. En la categoría de poli(aminoácidos), los poli(aminoácidos) de interés tendrán generalmente un peso molecular de desde aproximadamente 5.000 hasta 5.000.000, más habitualmente un peso molecular de desde aproximadamente 20.000 hasta 1.000.000; entre las hormonas de interés, los pesos moleculares oscilarán habitualmente entre un peso molecular de aproximadamente 5.000 y 60.000.

65

- Puede considerarse una amplia variedad de proteínas en cuanto a la familia de proteínas que tienen características estructurales similares, proteínas que tienen funciones biológicas particulares, proteínas relacionadas con microorganismos específicos, particularmente microorganismos que provocan enfermedades, etc. Tales proteínas incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas, citocinas, enzimas, hormonas, antígenos de cáncer, marcadores
- 5 nutricionales, antígenos específicos de tejido, etc. Tales proteínas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, protaminas, histonas, albúminas, globulinas, escleroproteínas, fosfoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, glicoproteínas, receptores de células T, proteoglicanos, HLA, proteínas sin clasificar, por ejemplo, somatotropina, prolactina, insulina, pepsina, proteínas que se encuentran en plasma humano, factores
- 10 de coagulación sanguínea, hormonas proteicas tales como, por ejemplo, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, luteotropina, prolactina, gonadotropina coriónica, hormonas tisulares, citocinas, antígenos de cáncer tales como, por ejemplo, PSA, CEA, a-fetoproteína, fosfatasa ácida, CA19.9 y CA125, antígenos específicos de tejido, tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina, mioglobina, CPK-MB y calcitonina, y hormonas peptídicas. Otros materiales poliméricos de interés son mucopolisacáridos y polisacáridos.
- 15 Para analitos receptores, los pesos moleculares oscilarán generalmente entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 2×10^8 , más habitualmente entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 10^6 . Para inmunoglobulinas, IgA, IgG, IgE e IgM, los pesos moleculares variarán generalmente entre aproximadamente 160.000 y aproximadamente 10^6 . El peso molecular de las enzimas oscilará normalmente entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 1.000.000. El peso molecular de los receptores naturales varía ampliamente, siendo
- 20 generalmente de al menos aproximadamente 25.000 y puede ser un peso molecular de aproximadamente 10^6 o mayor, incluyendo materiales tales como avidina, ADN, ARN, globulina fijadora de tiroxina, prealbúmina fijadora de tiroxina, transcortina, etc.
- 25 El término analito incluye además analitos de oligonucleótido y polinucleótido tales como ARNm, ARNr, ARNt, ADN, dúplex de ADN-ARN, etc.
- El analito puede ser una molécula que se encuentra directamente en una muestra tal como tejido biológico, incluyendo fluidos corporales de un huésped. La muestra puede examinarse directamente o puede pretratarse para hacer que el analito sea más fácilmente detectable eliminando materiales no deseados. La muestra puede
- 30 pretratarse para separar o lisar células; precipitar, hidrolizar o desnaturalizar proteínas; hidrolizar lípidos; solubilizar el analito; o similar. Tal pretratamiento puede incluir, sin limitación: centrifugación; tratamiento de la muestra con un disolvente orgánico, por ejemplo, un alcohol, tal como metanol; y tratamiento con detergentes. La muestra puede prepararse en cualquier medio conveniente que no interfiera con un ensayo. Se prefiere un medio acuoso.
- 35 El analito de interés puede determinarse detectando un agente probatorio del analito de interés tal como un miembro de par de unión específica complementario al analito de interés, cuya presencia sólo se detectará cuando esté presente el analito de interés en una muestra. Por tanto, el agente probatorio del analito se convierte en el analito que se detecta en un ensayo.
- 40 El tejido biológico incluye tejido extirpado de un órgano u otra parte del cuerpo de un huésped y fluidos corporales, por ejemplo, orina, sangre completa, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, mucosidad, y similares. En muchos casos, la muestra es plasma o suero.
- 45 Polinucleótido - un compuesto o una composición que es un nucleótido polimérico que tiene en el estado natural de aproximadamente 50 a 500.000 nucleótidos o más y que tiene en el estado aislado de aproximadamente 15 a 50.000 nucleótidos o más, habitualmente de aproximadamente 15 a 20.000 nucleótidos, más frecuentemente de 15 a 10.000 nucleótidos. Polinucleótido incluye ácidos nucleicos procedentes de cualquier fuente en forma purificada o no purificada, que se producen de manera natural o producidos de manera sintética, incluyendo ADN (ADNbc y ADNmc) y ARN, habitualmente ADN, y puede ser ARNt, ARNm, ARNr, ADN y ARN mitocondrial, ADN y ARN de
- 50 cloroplastos, híbridos de ADN-ARN, o mezclas de los mismos, genes, cromosomas, plásmidos, los genomas de material biológico tal como microorganismos, por ejemplo, bacterias, levaduras, virus, viroides, mohos, hongos, plantas, animales, seres humanos, y fragmentos de los mismos, y similares.
- Ligando - cualquier compuesto orgánico para el que existe de manera natural un receptor o que puede prepararse.
- 55 Hapteno - un compuesto que puede unirse específicamente a anticuerpos correspondientes, pero que no actúa por sí mismo como inmunógeno (o antígeno) para la preparación de los anticuerpos. Pueden prepararse anticuerpos que reconocen un hapteno frente a compuestos que se componen del hapteno unido a un portador inmunogénico (o antigénico). Los haptenos son un subconjunto de ligandos.
- 60 Análogo de ligando - un ligando modificado, un análogo de radical orgánico o analito, habitualmente de un peso molecular mayor de 100, que puede competir con el ligando análogo por un receptor, proporcionando la modificación medios para unir un análogo de ligando a otra molécula. El análogo de ligando diferirá habitualmente del ligando en más de la sustitución de un hidrógeno por un enlace que une el análogo de ligando a un centro o una etiqueta, pero
- 65 no es necesario. El análogo de ligando puede unirse al receptor de manera similar al ligando. El análogo podría ser, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra el idiotipo de un anticuerpo frente al ligando.

Receptor (“anti-ligando”) - cualquier compuesto o composición que puede reconocer una organización espacial y polar particular de una molécula, por ejemplo, sitio epitópico o determinante. Los receptores ilustrativos incluyen receptores que se producen de manera natural, por ejemplo, globulina fijadora de tiroxina, anticuerpos, enzimas, fragmentos Fab, lectinas, ácidos nucleicos, proteína A, componente del complemento C1q, y similares.

Anticuerpo - una inmunoglobulina que se une específicamente a y se define de este modo como complementaria con una organización espacial y polar particular de otra molécula. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede prepararse mediante técnicas que se conocen bien en la técnica tales como inmunización de un huésped y recogida de sueros (policlonales) o preparando líneas celulares híbridas continuas y recogiendo la proteína secretada (monoclonal), o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican al menos para las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmento de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado siempre que se mantenga la afinidad de unión para una molécula particular.

Sustituido – significa que se ha reemplazado un átomo de hidrógeno de una molécula por otro átomo, que puede ser un único átomo tal como un halógeno, etc., o parte de un grupo de átomos que forman una funcionalidad tal como se describió anteriormente. Tal sustituyente puede ser un grupo o una funcionalidad que confiere hidrofobicidad. Tal como se comentó anteriormente, puede lograrse hidrofobicidad mediante un grupo funcional que tiene uno o más átomos tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, etc.; tales grupos incluyen sulfonato, sulfato, fosfato, amidina, fosfonato, carboxilato, hidroxilo particularmente polioles, amina, éter, amida, y similares.

Sistema de producción de señales (“sps”) - uno o más componentes, siendo al menos un componente una etiqueta detectable, que generan una señal detectable que está relacionada con la cantidad de etiqueta unida y/o no unida, es decir la cantidad de etiqueta unida o no unida al compuesto que está detectándose. La etiqueta es cualquier molécula que produce o puede inducirse que produzca una señal, y puede ser, por ejemplo, un agente fluorescente, una radioetiqueta, enzima, un agente quimioluminiscente o fotosensibilizador. Por tanto, la señal se detecta y/o mide detectando actividad enzimática, luminiscencia, absorbancia de luz o radiactividad según sea el caso.

Las etiquetas adecuadas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, enzimas tales como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (“G6PDH”) y peroxidasa del rábano; ribozima; un sustrato para una replicasa tal como QB replicasa; promotores; colorantes; agentes fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftalaldehído, y fluorescamina; agentes quimioluminiscentes tales como isoluminol; sensibilizantes; coenzimas; sustratos enzimáticos; radioetiquetas tales como ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴C, ³H, ⁵⁷Co y ⁷⁵Se; partículas tales como partículas de látex o carbono; sol metálico; cristalito; liposomas; células, etc., que pueden marcarse además con un colorante, catalizador u otro grupo detectable. Se dan a conocer enzimas y coenzimas adecuadas en Litman, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.275.149, columnas 19-28, y Boguslaski, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.318.980, columnas 10-14; se dan a conocer agentes fluorescentes y agentes quimioluminiscentes adecuados en Litman, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.275.149, en las columnas 30 y 31.

Existen numerosos métodos mediante los que la etiqueta puede producir una señal detectable mediante medios externos, de manera deseable mediante examen visual, por ejemplo, mediante radiación electromagnética, calor y reactivos químicos. La etiqueta u otros miembros de sps también pueden unirse a un miembro de sbp, otra molécula o a un soporte.

Las etiquetas incluyen grupos detectables por medio de radiación electromagnética o mediante detección electroquímica incluyendo colorantes, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes e isótopos radiactivos.

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

Alternativamente, la etiqueta puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema de producción de señales incluirá entonces todos los componentes requeridos para producir una señal medible, que pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones de metales, y una sustancia de unión específica requerida para la unión de sustancias de generación de señales. Puede encontrarse un análisis detallado de sistemas de producción de señales adecuados en Ullman, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.185.243, columnas 11-13.

La etiqueta y/u otro miembro de sps puede unirse a un miembro de sbp o a un soporte. Por ejemplo, la etiqueta puede unirse covalentemente a un miembro de sbp tal como, por ejemplo, un anticuerpo; un receptor para un anticuerpo, un receptor que puede unirse a una molécula pequeña conjugada con un anticuerpo, o un análogo de ligando. La unión de la etiqueta al miembro de sbp puede lograrse mediante reacciones químicas que dan como resultado el reemplazo de un átomo de hidrógeno de la etiqueta por un enlace al miembro de sbp o puede incluir un grupo de unión entre la etiqueta y el miembro de sbp. Otros miembros de sps también pueden unirse covalentemente a miembros de sbp. Por ejemplo, dos miembros de sps tales como un agente fluorescente y un extintor pueden unirse cada uno a un anticuerpo diferente que forma un complejo específico con el analito. La formación del complejo pone el agente fluorescente y el extintor en estrecha proximidad, permitiendo por tanto que el extintor interactúe con el agente fluorescente para producir una señal. Se conocen bien en la técnica métodos de conjugación. Véase, por ejemplo, Rubenstein, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.817.837.

Ensayo - método para la determinación de la presencia o la cantidad de un analito.

Medición de la cantidad de un analito - métodos cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos así como cualquier otro método para determinar un analito se consideran que son métodos de medición de la cantidad de un analito. Por ejemplo, un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia de un analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito, se considera que está incluido dentro del alcance de la presente invención. Los términos "detectar" y "determinar," así como otros sinónimos comunes de medir, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

Materiales auxiliares – Frecuentemente se emplearán diversos materiales auxiliares en el ensayo según la presente invención. Por ejemplo, normalmente estarán presentes tampones en el medio de ensayo, así como estabilizadores para el medio de ensayo y los componentes de ensayo. Frecuentemente, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; disolventes orgánicos tales como formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos; potenciadores de la unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; o similares.

De manera total o parcialmente secuencial - cuando se combinan diversos agentes de modo distinto a de manera concomitante (simultáneamente), pueden combinarse uno o más con uno o más de los agentes restantes para formar una subcombinación.

La invención se demuestra además mediante los siguientes ejemplos ilustrativos.

35 Ejemplos

Las partes y los porcentajes en el presente documento son en peso a menos que se indique de otro modo. Las temperaturas son en grados centígrados (°C).

40 Abreviaturas:

EDTA - ácido etilendiaminatetraacético

45 CTNI - Tropinina C

HAMA - anticuerpo humano anti-ratón

BSA - albúmina sérica bovina

50 MES - ácido 2-morfolinoetanosulfónico

PBS - solución salina tamponada con fosfato a pH y fuerza iónica fisiológicos

55 CMO – carboximetoxiamina

CV - coeficiente de variación

Tampón HEPES –

60 kDa – kiloDalton

NSB - unión no específica

65 Materiales:

Productos químicos:

A menos que se indique de otro modo, se adquirieron todos los productos químicos de Sigma-Aldrich Company (St. Louis MO). Se adquirieron los bloqueantes de HAMA de Roche Diagnostics Corporation (Roche Applied Science, Indianápolis IN) y de Scantibodies Laboratory, Inc. 9336 Abraham Way Santee, CA 92071 EE.UU. El grado de BSA usado para las reacciones de conjugación se conoce como BSA "libre de ácidos grasos".

Muestras de prueba:

Se examinaron muestras de un banco de sangre local para determinar si producían una respuesta con el ensayo de troponina. Se supuso que cualquier muestra de donante que producía un resultado positivo con la prueba de troponina era un falso positivo. Esto se confirmó sometiendo a prueba todas las muestras que dieron respuestas positivas con al menos un método de referencia disponible comercialmente. Para los resultados notificados en el presente documento, se confirmaron los resultados de prueba usando la prueba de troponina (CTNI) DIMENSION Rxl® de Dade Behring. Se examinaron adicionalmente las muestras con falso positivo para determinar causas conocidas de falsa positividad. La causa primaria fundamental de los resultados de falso positivo son anticuerpos humanos que se unen a anticuerpos de ratón, una interferencia conocida como "HAMA" (anticuerpos humanos anti-ratón). El proceso de examen usado para determinar si las muestras tienen interferencia de tipo HAMA consiste en añadir agentes de unión a HAMA conocidos (también conocidos como agentes bloqueantes) que están disponibles comercialmente de Roche y Scantibodies. Si una muestra que da una respuesta positiva se vuelve normal cuando se añaden agentes de unión a HAMA a la muestra, se supone que la muestra es un falso positivo debido a HAMA. Algunas muestras no se corrigieron mediante la adición de agentes de unión a HAMA. Estas se usaron en las pruebas descritas en los siguientes ejemplos.

Ensayos de prueba:

Se usó un ensayo para CTNI, descrito en "Quantitation of Cardiac Markers by LOCI™ Technology", R. Bauer, *et al.*, (Clinical Chemistry 2004; 50(6 suplemento): A5) para la evaluación de los compuestos bloqueantes candidatos. Los reactivos para realizar este ensayo consisten en un látex acceptor recubierto con anticuerpo (perla aceptora) que emite luz cuando se pone en contacto mediante oxígeno singlete, un anticuerpo biotinilado y un látex donador recubierto con estreptavidina que produce oxígeno singlete cuando se ilumina con luz de longitudes de onda que se absorben por un colorante fotosensibilizador disuelto en las partículas de látex. Se unió la estreptavidina del látex donador a las partículas de látex a través de un espaciador de dextrano con grupos de unión a aldehído. En el caso de las perlasceptoras, se conectó el anticuerpo a las partículas a través de un grupo de unión o espaciador que resulta de una combinación de aminodextrano y dextranaldehído. Para ambos reactivos de látex, los grupos aldehído en exceso que quedan tras la unión de las proteínas se hacen reaccionar con carboximetoxiamina para extinguir los aldehídos.

Estos reactivos se envasan en recipientes FLEX® que sirven como depósitos para el analizador clínico automatizado VISTA™ que se describe en "Development and Initial Performance of a New High-Volume Multi-Detector Analyzer: The DIMENSION VISTA™ Integrated System", T. Evers, *et al.* (Clinical Chemistry 2004; 50(6 suplemento)) A31. Los kits de prueba y el analizador están disponibles de Dade Behring Inc., Newark, DE, EE.UU. Se sometieron a prueba los reactivos bloqueantes candidatos (conjugados proteína-polisacárido solubles (formados previamente o formados *in situ*) que reducen o eliminan la interferencia de componentes de la muestra) añadiéndolos (o un precursor tal como, por ejemplo, dextranaldehído) al reactivo de anticuerpo biotinilado en recipientes FLEX® prototipo o en algunos casos directamente en la muestra. Los recipientes FLEX® son de Dade Behring Inc.

Cada resultado de prueba mostrado en las tablas a continuación es el promedio de cuatro resultados de prueba. En general, la precisión de las mediciones fue < 2% de CV para los calibradores y para mediciones de muestras discrepantes en aquellos casos en los que se usaron bloqueantes eficaces. Se realizaron las pruebas en días diferentes con instrumentos diferentes, de modo que fueron necesarias muchas pruebas de control para permitir la comparación de diferentes conjuntos de datos.

Ejemplo 1

Síntesis de conjugado proteína-polisacárido soluble

Parte A: Síntesis de dextranaldehído

Se añadieron lentamente cien gramos (100 g) de dextrano de 100-200 kDa con agitación a 400 ml de agua desionizada que contenía 0,5 g de EDTA en un matraz de fondo redondo de 1 l equipado con una purga de nitrógeno. A esta mezcla, se le añadieron 40 g de NaOH seguido por 15 ml de 2-(4-clorobutil)-1,3-dioxolano. Se calentó la mezcla hasta 90° y se mantuvo a esa temperatura con agitación durante 24 horas. En este momento, se añadieron 250 ml de agua, y se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente usando un baño de hielo. Entonces se ajustó el pH a 6,0-6,5 añadiendo lentamente HCl 12 N con agitación. Entonces se purificó la mezcla mediante diafiltración usando un cartucho de diafiltración de fibra hueca que tiene un punto de corte de peso molecular de

10.000 Dalton. Se intercambió un total de 60 l de agua desionizada en el procedimiento. Se retiró el dioxolano intermedio del aparato de diafiltración, y se ajustó el volumen a 1200 ml.

5 Se añadió ácido toluenosulfónico (68,5 g) a la disolución de dioxolano, y se ajustó el pH a 1,8 con piridina. Se dejó la mezcla en reposo durante 16 horas a temperatura ambiente, y entonces se ajustó el pH a 6,0 con NaOH 1 N. Se purificó de nuevo usando un cartucho de diafiltración de fibra hueca de punto de corte de 10.000 Dalton, mediante intercambio de 125 l de agua.

10 Tras la retirada del producto del sistema de diafiltración, se ajustó su concentración a aproximadamente 50 mg/ml, y entonces se tamponó a pH 7,0 mediante la adición de 0,69 mg/ml de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 0,71 mg/ml de fosfato de sodio dibásico anhidro. Se determinó que el contenido de sólidos era de 45,9 mg/ml.

15 Se usó el mismo procedimiento con dextrano de 500 kDa para preparar una versión de dextransalaldehído de mayor peso molecular.

Parte B: Síntesis de conjugados dextransalaldehído/proteína

20 Se usó el mismo esquema de síntesis general descrito en la parte A para una serie de diferentes conjugados que diferían en la razón de dextransalaldehído con respecto a proteína, el peso molecular del dextransalaldehído y el tipo de proteína. La nomenclatura usada para identificar la composición de los conjugados solubles candidatos es: xmwtdexal-proteínaymg/100 mg de dextransalaldehído. Por ejemplo, 100-200-dexal-BSA-30 sería un producto producido con dextransalaldehído preparado a partir de dextrano de 100-200 kDa que se había conjugado con BSA a una razón de 100 partes de dextransalaldehído con respecto a 30 partes de BSA.

25 Preparación de 100-200dexal-BSA30: Se añadieron 1,5 ml de una disolución de 20 mg/ml de BSA en pH 6,0, tampón MES 50 mM con agitación a 2,18 ml de una disolución de dextransalaldehído que contenía 100 mg. Tras completarse la adición, se añadieron 0,3 ml de una disolución de 100 mg/ml de cianoborohidruro de sodio con agitación. Se puso la mezcla en un baño de aire con agitador y se mantuvo a 37°C durante 18 horas. Entonces se puso en una bolsa de diálisis con punto de corte de peso molecular de 6000-8000 y se dializó frente a 1 l de agua desionizada, que se intercambiaba tres veces. El cuarto intercambio final fue frente a 1 l de tampón MES 50 mM pH 6,0.

Parte C: Síntesis de carboximetiloxima de dextransalaldehído

35 Se añadió un (1) ml de una disolución 1 M de hemiclrorhidrato de carboximetoxiamina a una disolución de 100 mg de dextransalaldehído de 100-200 kDa en 2,18 ml, y se incubó la mezcla a 37°C durante 2 horas. Entonces se puso en una bolsa de diálisis con punto de corte de peso molecular de 6000-8000 y se dializó frente a 1 l de agua desionizada, que se intercambiaba tres veces. La duración entre intercambios fue de 3-4 horas. El cuarto intercambio final fue frente a 1 l de tampón MES 50 mM pH 6,0.

Parte D: Síntesis de dextransalaldehído modificado con aminas alifáticas

45 El procedimiento para preparar dextransalaldehído modificado mediante diferentes aminas fue esencialmente el mismo, usando diferentes aminas, a diferentes concentraciones. La tabla 1 a continuación enumera las cantidades y las aminas que se usaron.

Tabla 1

Amina	PM	Cantidad usada	µmoles usados
Etanolamina	61	22,5 mg	369
Metilamina	31	33 µl	369

50 Se añadió la amina con agitación a 100 mg de dextransalaldehído en 2,18 ml, seguido por 0,3 ml de una disolución madre de 100 mg/ml en agua y se incubó la mezcla durante dos horas a 37°C. Entonces se puso en una bolsa de diálisis con punto de corte de peso molecular de 6000-8000 y se dializó frente a 1 l de agua desionizada, que se intercambiaba tres veces. La duración entre intercambios fue de 3-4 horas. El cuarto intercambio final fue frente a 1 l de tampón MES 50 mM pH 6,0.

Ejemplo 2

Pruebas de inmunoensayo

60 Parte A: Actividad de bloqueo comparativa de dextrano y conjugado dextransalaldehído/BSA formado *in situ* en un ensayo para troponina

5 El dextranaldehído reacciona con proteínas para formar bases de Schiff entre la funcionalidad aldehído y los grupos amino de lisina de proteínas, produciendo de ese modo un conjugado. Esta reacción se logró añadiendo 5 mg/ml de dextranaldehído de 500 KDa con respecto al reactivo de anticuerpo biotinilado del recipiente de CTNI FLEX®, que contiene 50 mg/ml de BSA en un tampón HEPES pH 7,2 con 1 mg/ml de dextrano de 100-200 kDa. En la tabla 2 a continuación se observa el efecto de la adición sobre la respuesta del ensayo frente a ambos calibradores (representando Cal 0, 0 ng/ml de troponina y representando Cal 8,3, 8,3 ng/ml de troponina) y muestras de falsos positivos discrepantes (identificadas como NSB 1-29).

10

Tabla 2

Muestras:	Sin dextranaldehído		Dextranaldehído añadido	
	Cuentas medias	Razón de cuentas, NSB/Cal0	Cuentas medias	Razón de cuentas, NSB/Cal0
Cal 0 ng/ml	7.978	N/A	7857	N/A
Cal 8,3 ng/ml	1.026.400	N/A	989444	N/A
NSB 1	767.083	96,15	10507	1,34
NSB 3	87.991	11,03	10049	1,28
NSB 7	44.076	5,52	9247	1,18
NSB 15	30.810	3,86	7920	1,01
NSB 16	20.211	2,53	7666	0,98
NSB 17	93.031	11,66	7715	0,98
NSB 18	14.232	1,78	7533	0,96
NSB 20	61.782	7,74	8589	1,09
NSB 21	319.324	40,03	8284	1,05
NSB 23	119.889	15,03	7771	0,99
NSB 26	24.607	3,08	8081	1,03
NSB 27	24.662	3,09	7431	0,95
NSB 29	19.800	2,48	7566	0,96

15

El conjugado con BSA formado *in situ* tuvo el efecto de llevar los resultados elevados falsamente casi hasta el mismo nivel que el calibrador cero ("Cal 0 ng/ml"). Sólo las muestras NSB 1, 3, 7 y 20 permanecieron significativamente elevadas por encima del fondo. Mediante comparación, los datos muestran que el dextrano sin modificar era relativamente ineficaz para bloquear la unión no específica.

20

La tabla 3 a continuación muestra el efecto de añadir 20 mg/ml de dos grados de dextrano de diferente peso molecular usando el mismo protocolo que anteriormente:

Tabla 3

20 mg/ml de dextrano 500		
Muestra	Media	Razón de cuentas, NSB/Cal0
Cal0	8.237	N/A
Cal8	1.273.769	N/A
NSB 1	13.082	1,59
NSB 3	11.440	1,39
NSB 7	8.691	1,06
20 mg/ml de dextrano 100-200		
Muestra	Media	Razón de cuentas, NSB/Cal0
Cal0	7.392	N/A
Cal8	953.703	N/A
NSB 1	18.736	2,53
NSB 3	9.613	1,30
NSB 7	8.006	1,08

25

En este ejemplo, se añadió el dextrano tanto al reactivo de anticuerpo biotinilado como al reactivo de perla aceptora y Cal 0 representaba una disolución de calibrador que tenía 0 ng/ml de troponina y Cal 8 representaba una disolución de calibrador que tenía 8,3 ng/ml de troponina. Hubo cierta mejora en comparación con el caso en el que no se añadió dextrano adicional, pero la mejora observada fue significativamente menor que con el conjugado proteína-polisacárido soluble, es decir, conjugado con BSA dextranaldehído/base de Schiff, de realizaciones de la invención.

30

Parte B: Pruebas de conjugados dextranaldehído/proteína

Tal como se observará en los ejemplos a continuación, los resultados con el conjugado *in situ*, que se usó como

control para otros experimentos, fueron variables de una serie a otra. Esto podría deberse al hecho de que la base de Schiff que se forma es inestable y se disocia y vuelve a asociarse espontáneamente. Para la formación *in situ* del conjugado soluble, el dextranaldehído debe añadirse o bien a la muestra antes del primer reactivo de ensayo o bien al reactivo que se mezcla en primer lugar con la muestra del paciente. En el caso en el que se forma el conjugado *in situ* en el reactivo, el reactivo debe contener una proteína tal como BSA o similar a una concentración de al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 1,5 mg/ml, al menos 2,0 mg/ml, etc.

En el primer experimento, se añadieron los materiales bloqueantes candidatos a los calibradores y la muestra discrepante NSB-1, y se mantuvo la mezcla durante media hora antes de realizarse las pruebas. Se añadieron los bloqueantes candidatos para dar una concentración de 1 mg/ml añadiendo 5 µl de una disolución madre 20 mg/ml a 0,1 ml de muestra. Se preparó el reactivo para la condición control identificado como "control de PBS" diluyendo el reactivo de anticuerpo biotinilado en la misma medida que en las pruebas con solución salina tamponada con fosfato (10 mM de fosfato de sodio, 120 mM de cloruro de sodio, 7,2 mM de cloruro de potasio, pH 7,2). Se muestran los resultados a continuación en la tabla 4.

Tabla 4

Aditivo	Cuentas de resultado de prueba			% de supresión*
	Cal 0	Cal 8	NSB 1	
PBS como control	8.916	979.811	999.031	0,0%
Dextranaldehído 500	8.809	864.795	9.950	99,88%
100-200-Dexal-BSA-10	8.389	954.766	26.160	98,2%
100-200-Dexal-BSA-30	8.460	969.563	11.242	99,7%
*% de supresión = 1- (NSB 1 de prueba - cal 0 de prueba)/(NSB 1 -Cal 0 control)				

Aunque se eliminó la mayor parte de la elevación no específica con los tres bloqueantes anteriores, todavía había una pequeña señal de falso positivo con la muestra NSB-1. Los resultados anteriores pueden ser aceptables para muchos ensayos; sin embargo, un ensayo de troponina tiene mayores demandas de control de la interferencia que muchos otros ensayos.

Se produjeron conjugados adicionales usando un mayor nivel de BSA en la síntesis, diferentes proteínas y también dextranaldehído de mayor peso molecular. Se pusieron los aditivos en el reactivo de anticuerpo biotinilado a una concentración de 5 mg/ml. Se resumen los resultados de las pruebas de estos conjugados en la tabla 5 a continuación:

Tabla 5

Aditivo de la serie 1	Cuentas de resultado de prueba			% de supresión*
	Cal 0	Cal 8	NSB 1	
PBS (control)	7.232	733.189	889.128	0,0%
100-200-Dexal-BSA-50, primer lote	6.578	743.213	7.005	99,95%
100-200-Dexal-BSA-50, segundo lote	7.136	807.327	7.134	100,00%
100-200-Dexal-BSA-100	7.320	823.386	7.544	99,97%
100-200-Dexal-IgG murina-20	6.619	794.745	7.909	99,85%
Aditivo de la serie 2	Cal 0	Cal 8	NSB 1	% de supresión*
PBS (control)	7.177	707.027	823.326	0,00%
100-200-Dexal-ovoalbúmina-100	6.370	734.218	39.569	95,93%
100-200-Dexal-ovoalbúmina-50	6.573	749.661	12.630	99,26%
*% de supresión = 1- (NSB 1 de prueba - cal 0 de prueba)/(NSB 1 -Cal 0 control)				

Aunque estos datos muestran en este experimento que el bloqueante más eficaz de la serie de conjugados de proteína era el basado en BSA, otras proteínas también dieron como resultado conjugados que mostraron un bloqueo eficaz de la interferencia. Además, en este experimento, el rendimiento de los conjugados parece alcanzar una meseta cuando la razón de dextranaldehído con respecto a BSA en la síntesis está en el intervalo de 2:1 a 1:1. Debe observarse que el intervalo de razón anterior es para dextranaldehído y BSA. En general, la razón dependerá de la naturaleza del polisacárido tal como, por ejemplo, la composición química, el peso molecular, etc., y de la naturaleza de la proteína tal como, por ejemplo, la composición química, el peso molecular, etc.

Parte C: Bloqueo con derivados de molécula pequeña/dextrano:

Se sometió a prueba una serie de derivados para comparar la actividad de bloqueo de dextrano y dextrano funcionalizado con respecto a los conjugados dextrano-proteína solubles de realizaciones de la presente invención.

Se realizaron pruebas de derivados de amina de bajo peso molecular de dextranaldehído añadiendo éstos a las muestras a una concentración de 1 mg/ml. En el caso del aditivo de dextranaldehído, se dejó la mezcla en reposo durante media hora antes de las pruebas para darle tiempo a reaccionar con las proteínas séricas de las muestras. En la tabla 6 a continuación, se muestran los resultados del ensayo comparativo:

5

Tabla 6

Aditivo	Cuentas de resultado de prueba			% de supresión*
	Cal 0	Cal 8	NSB 1	
PBS como control	8.916	979.811	999.031	0,0%
Dextranaldehído 500	8.809	864.795	9.950	99,88%
100-200-Dexal-etanolamina	9.018	971.960	216.201	79,1%
100-200-Dexal-metilamina	8.690	950.346	206.471	80,0%
*% de supresión = 1- (NSB 1 de prueba - cal 0 de prueba)/(NSB 1 -Cal 0 control)				

La capacidad de bloqueo de los derivados de dextranaldehído-alquilamina fue significativamente menor que la capacidad de bloqueo del producto de reacción de dextranaldehído con proteínas séricas de la muestra.

10

El siguiente experimento comparó la capacidad de bloqueo del producto de reacción de dextranaldehído con proteínas BSA en la muestra con la capacidad de bloqueo del derivado de carboximetiloxima (CMO) de dexal, que no puede reaccionar con proteínas séricas.

15

En este caso, se añadieron los aditivos de prueba al reactivo de anticuerpo biotinilado a una concentración de 5 mg/ml. En la tabla 7 a continuación, se muestran los resultados de prueba:

20

Tabla 7

Aditivo	Cuentas de resultado de prueba			% de supresión*
	Cal 0	Cal 8	NSB 1	
PBS (control)	8.298	1.011.502	1.049.243	0,0%
Dextranaldehído de 500 KDa	7.857	989.444	10.507	99,7%
100-200-Dexal-CMO	8.384	1.052.110	1.026.872	2,2%
*% de supresión = 1- (NSB 1 de prueba - cal 0 de prueba)/(NSB 1 -Cal 0 control)				

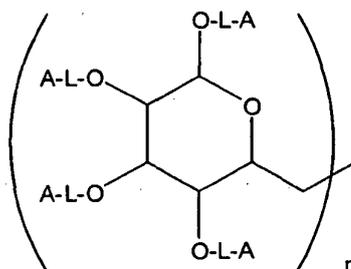
El producto de reacción de base de Schiff de dextranaldehído y BSA es significativamente más eficaz bloqueando la interferencia de lo que lo es el derivado de carboximetiloxima de dexal.

25

REIVINDICACIONES

1. Composición para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra que se sospecha que contiene dicho analito, en la que la composición comprende

(i) un compuesto soluble que comprende un conjugado proteína-polisacárido que comprende unidades de repetición de monosacárido y es de fórmula:



en la que uno de los A es un enlace con el carbono glicosídico C1 (tal como se indica en la fórmula anterior) de otra de las unidades, n es un número entero de aproximadamente 3 a aproximadamente 50.000, los otros A se seleccionan independientemente del grupo que consiste en moléculas de proteína, hidrógeno, grupos que confieren solubilidad en agua o sustituyentes que reducen la cristalinidad, y L es un enlace o un grupo de unión, y la razón de moléculas de proteína con respecto a moléculas de monosacárido está en el intervalo de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:100, y

en la que, cuando L es un grupo de unión y A es una proteína, L-A tiene la fórmula:



en la que m es un número entero de 0 a aproximadamente 5, R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo inferior y arilo, o R y R' pueden tomarse juntos para formar un doble enlace y

(ii) reactivos para detectar dicho analito, en los que al menos uno de dichos reactivos comprende un soporte sólido que comprende un segundo polisacárido,

en la que dichos reactivos comprenden una pareja de unión específica y en la que dicha proteína no se une a ninguno de dichos reactivos ni a dicho analito.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que cuando L es un grupo de unión, L tiene la fórmula:



en la que m y p son independientemente números enteros de 0 a aproximadamente 5, R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo inferior y arilo, o L tiene la fórmula:



en la que m y p son independientemente números enteros de 0 a aproximadamente 5, y R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo inferior y arilo.

3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha proteína es una proteína sérica.
4. Composición según la reivindicación 3, en la que dicha proteína sérica se selecciona del grupo que consiste en albúminas y gamma-globulinas.
5. Composición según una de las reivindicaciones 1-4, en la que el polisacárido del conjugado proteína-polisacárido es dextrano o un derivado de dextrano.
6. Método para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra que se sospecha que contiene dicho analito, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar en combinación dicha muestra y una composición según una de las reivindicaciones 1-5,

- (b) incubar dicha combinación en condiciones para la unión de dicho analito a uno o más de dichos reactivos, y
- 5 (c) detectar la presencia y/o la cantidad de unión de dicho analito a uno o más de dichos reactivos, estando relacionada la presencia y/o la cantidad de dicha unión con la presencia y/o la cantidad de dicho analito en dicha muestra.
7. Método para reducir la unión no específica en un ensayo de unión para la determinación de un analito en una muestra, comprendiendo dicho método incluir en un medio de ensayo para realizar dicho ensayo de unión una composición según una de las reivindicaciones 1-5.
- 10 8. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho compuesto soluble tiene una carga neutra o una carga negativa.
- 15 9. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho primer polisacárido y dicho segundo polisacárido son iguales.
10. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que el comportamiento de unión por afinidad de dicho compuesto soluble es mejor que el comportamiento de unión por afinidad de dicho segundo polisacárido sobre dicho soporte.
- 20 11. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho soporte sólido comprende partículas.
12. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho segundo polisacárido se une a dicho soporte sólido y un miembro de un par de unión específica se une a dicho segundo polisacárido.
- 25 13. Método según la reivindicación 7, en el que dicho primer polisacárido y dicho segundo polisacárido comprenden la misma subunidad de polímero de monosacárido pero difieren en el peso molecular.
- 30 14. Método según la reivindicación 13, en el que el peso molecular de dicho primer polisacárido es mayor que el peso molecular de dicho segundo polisacárido.
15. Composición según una de las reivindicaciones 1-5, en la que en el conjugado proteína-polisacárido la proteína y el polisacárido se unen entre sí con una unión que tiene sustancialmente la misma estructura química que la unión usada para unir dicho miembro de un par de unión específica a dicho segundo polisacárido unido a dicho soporte sólido según la reivindicación 12.
- 35 16. Composición según la reivindicación 15, en la que la unión difiere en la homología.
- 40 17. Método para determinar la presencia y/o la cantidad de un analito en una muestra que se sospecha que contiene dicho analito, comprendiendo dicho método:
- 45 (a) proporcionar en combinación dicha muestra, un compuesto soluble que comprende una proteína unida a un primer polisacárido, y reactivos para detectar dicho analito, en el que al menos uno de dichos reactivos comprende un soporte sólido que comprende un segundo polisacárido, en el que dichos reactivos comprenden una pareja de unión específica y en el que dicha proteína no se une a ninguno de dichos reactivos ni a dicho analito y en el que dicho primer polisacárido y dicho segundo polisacárido pueden ser iguales o diferentes,
- 50 (b) incubar dicha combinación en condiciones para la unión de dicho analito a uno o más de dichos reactivos, y
- 55 (c) detectar la presencia y/o la cantidad de unión de dicho analito a dicha pareja de unión específica para dicho analito, estando relacionada la presencia y/o la cantidad de dicha unión con la presencia y/o la cantidad de dicho analito en dicha muestra.