



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 265 646**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/72 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **96923333 .7**

(86) Fecha de presentación : **19.06.1996**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0840895**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.1998**

(54) Título: **Métodos para obtener complejos receptor:ligante liberador (reland) y ensayos de prueba.**

(30) Prioridad: **22.06.1995 US 493420**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

(73) Titular/es: **SEREX, Inc.**
230 West Passaic Street
Maywood, New Jersey 07607, US

(72) Inventor/es: **Fitzpatrick, Judith y**
Lenda, Regina

(74) Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para obtener complejos receptor:ligante liberador (reland) y ensayos de prueba.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de obtener complejos estables receptor:ligante liberador (llamado aquí “reland” como es definido debajo), y métodos para usarlos. Se refiere a los métodos para determinar la presencia de un analito en una muestra. Más particularmente, se refiere a los ensayos de descarga en fase líquida homogénea y en fase líquida heterogénea/fase sólida, que son muy específicos y sensibles. Los métodos de la invención incrementan considerablemente la sensibilidad, especificidad, y rango dinámico de los ensayos para los analitos y disminuyen el tiempo y complejidad de tales ensayos.

Antecedentes de la invención

Los inmunoensayos utilizan las capacidades aglutinantes específicas de anticuerpos o antígenos para detectar la presencia de un blanco de moléculas en una muestra. Aunque el principio general es aplicable a un rango amplio de problemas, el mayor interés comercial se ha centrado en las aplicaciones de diagnóstico médico para una variedad amplia de analitos en fluidos biológicos como sangre, saliva, y orina.

Ya existen varios tipos de inmunoensayos útiles para distintas aplicaciones. Cada tipo de estos ensayos requiere una manera de distinguir si los sitios aglutinantes en un anticuerpo están ocupados o libres. Típicamente, esto es acompañado por medio de una marca, de igual forma que un átomo, molécula, enzima o partícula está unida permanentemente al anticuerpo o al analito o a un análogo del analito.

Sensibilidad y especificidad son parámetros claves de un inmunoensayo. La especificidad se refiere principalmente al sitio aglutinante antígeno del anticuerpo, lo cual es inherente a la selección de los segmentos gene de la región variable y es independiente de la configuración del ensayo. La sensibilidad se refiere principalmente a la afinidad del anticuerpo por su ligante y a la inherente detectabilidad de la marca. Por ejemplo, radioisótopos, usados para radio-inmunoensayo, pueden ser detectados a concentraciones significativamente más bajas que las moléculas fluorescentes. Las marcas de la enzima son detectables a concentraciones similares a las marcas de los fluorescentes. Cuando los sustratos que producen productos fluorescentes o quimiluminiscentes son usados con marcadores de enzima, la sensibilidad de los resultados de los inmunoensayos, es comparable o mayor que con marcadores de radioisótopos.

Hasta la fecha, los inmunoensayos para diagnósticos han entrado en dos categorías básicas: inmunoensayos tipo bocadillo, el cual mide directamente la presencia de un analito “capturándolo” entre dos anticuerpos, e inmunoensayos competitivos, en que el analito compite con un aglomerante designado para aglutinar al anticuerpo. Sin embargo, estas técnicas de ensayo tienen sus inconvenientes. El inmunoensayo tipo bocadillo requiere que el analito sea lo suficientemente largo para acomodar el aglutinante entre dos anticuerpos, y es así más conveniente para analitos mayores, como las proteínas. Los ensayos competitivos, en los cuales un analito y el ligante tienen afinidades aglutinantes comparables por el anticuerpo, se manejan principalmente por la acción de masa, y por consiguiente falta sensibilidad o rango dinámico, o ambos. Donde la afinidad del analito y el ligante por el anticuerpo son significativamente diferentes, el ensayo se hace demasiado sensible a los efectos de la matriz, ya que la menor interacción de la afinidad aglutinante está más influenciada por variables tales como temperatura, pH, concentración de sal, y la presencia de agentes desnaturizantes (por ejemplo, en la orina)

Muchas técnicas de ensayo convencionales se consideran competitivas debido a que el analito y el componente designado tienen afinidades comparables por el sitio aglutinante del anticuerpo. Un ejemplo de tal método competitivo se encuentra en EE.UU. Patente No. 3,817,837 de Rubenstein y Ullman, los cuales describen una técnica en la cual el analito y el conjugado enzima:ligante compiten por los sitios aglutinantes del anticuerpo. Como la liga del anticuerpo al conjugado enzima:ligante altera su actividad enzimática, la concentración de analito presente puede estimarse midiendo la velocidad a la cual tal mezcla convierte el sustrato en producto.

Una variación en los ensayos competitivos es el ensayo disociativo, el cual utiliza un complejo preformado anticuerpo:ligante con una constante de disociación alta, y en él la competencia ocurre después de la disociación del ligante desde el anticuerpo. Este tipo de ensayo no ha sido reportado- para tener cualquier ventaja significativa sobre los ensayos competitivos convencionales. Los ensayos disociativos actuales tales como algunos ensayos de polarización fluorescencia no proporcionan un complejo inmune preformado estable, sino requieren ligante adicional al anticuerpo varios minutos antes de la adición del analito, resultando una complejidad incrementada.

Los inmunoensayos pueden ser además caracterizados como homogéneos o heterogéneos. En un método heterogéneo, la marca es igualmente perceptible en los estados limitado y no limitado. Para obtener resultados significativos de cualquier ensayo se requiere la separación física del anticuerpo limitado desde el anticuerpo no limitado. Una estrategia común por lograr esta separación trae consigo asociado la designación de una fase sólida la cual puede ser separada físicamente desde la fase líquida previa a la etapa de detección. Un ensayo heterogéneo típico es el Conjunto Elisa CotiTraq® para detectar la cotinina en la orina de Serex, Inc., Maywood, New Jersey.

En un método homogéneo, la propiedad perceptible de la marca es inherentemente diferente dependiendo de si está limitada o no al anticuerpo. En su estado limitado, la marca tendrá mayor o menor intensidad de señal. Normalmente, la aglomeración del anticuerpo al ligante designado causa una disminución en la intensidad de la señal, por ejemplo, cuando el designado es una enzima. Productos típicos en esta categoría incluyen la línea EMIT® de inmunoensayos de enzima de la Compañía Syva, Palo Alto, California, y la línea TDX de inmunoensayos de polarización fluorescencia de Abbot Diagnostics, Chicago, Illinois.

Dos características más de los inmunoensayos son particularmente notables. Éstas son la concentración mínima de analito que puede ser detectada, y el rango dinámico de detección. El rango dinámico es el rango de concentraciones del analito sobre el cual la señal de un marcador cambia del cero al máximo. El orden en el que la muestra, el anticuerpo y un componente designado se combinan puede afectar significativamente a estos dos parámetros claves afectando el grado de aglomeración del componente designado, lo que al final afecta la detección de la marca.

En ciertos métodos de ensayo conocidos, el anticuerpo y el analito se combinan previo a la adición del componente marcado. En otros, el analito y el componente marcado se combinan previa a la adición del anticuerpo. Cada uno de estos casos requiere el suministro de dos reactivos separados que se combinan con la muestra que contiene el analito. La necesidad para estos dos reactivos separados puede ser inconveniente y resulta en un método complejo más embarazoso. Más aún, como la medición volumétrica precisa de cada reactivo es crítica para un buen desarrollo del ensayo, la necesidad de dos etapas de medición puede causar errores que pueden llevar a resultados distorsionados.

Un método de mejorar la precisión del ensayo y con ello reforzar su sensibilidad es proporcionar un complejo premezclado del anticuerpo y el componente marcado. Sin embargo, esto es problemático, porque la reacción de aglomeración generalmente es virtualmente irreversible en la mayoría de las condiciones de ensayo. Así, cuando un complejo preformado del analito marcado y el anticuerpo se combinan con una solución que contiene el analito, ningún desplazamiento apreciable del nivel límite ocurre en un horario significativo (minutos)

WO 93/03367 describe un método de ensayo para la presencia de analito en una muestra, usando un complejo receptor-ligante.

Hinds y otros (1984) Chin. Chem. 30, 1174-1178 se refiere a un inmunoensayo de la enzima para medir el suero de teofilina.

GB2 078 370 A se refiere a un método de llevar a cabo un ensayo de aglomeración EP 0 077 896 A referido a los derivados de la teofilina, anticuerpos para la teofilina y su uso en inmunoensayos.

WO 95/16026 se refiere a los reactivos y métodos para la detección del metotrexato.

EE.UU. 4,434,236 se refiere a un inmunoensayo.

Sumario de la invención

Los métodos de obtener los complejos del receptor:reland se proporcionan en la invención. El término reland es una palabra abreviada significando ligante liberador. La presente invención está basada en el descubrimiento de que un reland, seleccionado de acuerdo con esta invención puede hacer complejo con un receptor e impartir al complejo receptor:reland propiedades no descritas en la técnica anterior. Los complejos obtenidos son estables, es decir casi irreversibles en la ausencia de analito, pero sorprendentemente cuando entran en contacto con el analito son casi completamente inestables lo que resulta en la descarga rápida del reland. La descarga del reland desde el complejo estable receptor:reland en la presencia de analito es la esencia de la invención. El reland puede estar en una forma monomérica o multimérica como se describirá más ampliamente aquí debajo.

La presente invención también se refiere a la metodología que emplea el complejo estable obtenido del reland con un receptor para un analito donde el complejo receptor:reland es capaz de liberar el reland en la presencia de un analito. El reland, apropiadamente designado, es perceptible, con lo cual indica positivamente la presencia de analito en una muestra de prueba cuando el método se usa en un formato de ensayo diagnóstico. Se proporcionan los métodos para diseñar, preparar, usar y estabilizar tales complejos. La metodología es aplicable a ambos, a los ensayos homogéneos y a los ensayos heterogéneos para analitos que abarcan un rango amplio de tipos y tamaños. Los ensayos de la presente invención superan las desventajas e inconvenientes de los ensayos de diagnóstico de la técnica anterior como por ejemplo detectando la presencia de un analito en un tiempo más corto, con mayor sensibilidad y un rango dinámico mayor de los que han sido posibles hasta ahora en el diseño de un ensayo simple.

La invención también es aplicable a ambos reactivos para los ensayos de diagnóstico *en vivo* y los métodos terapéuticos del tratamiento. Por ejemplo, en un aspecto amplio, la presente invención suministra métodos para obtener complejos útiles en los métodos nuevos para alcanzar y reaccionar con un sitio específico en el cuerpo. El método comprende deliberadamente un complejo receptor:reland para un sitio en el cuerpo y al detectar la aglomeración del receptor en el sitio le sigue la descarga del reland desde el complejo. En este caso, la detección se facilita por la incorporación de una "marca", o sistema de detección en todo o en parte, dentro del receptor, o el agente terapéutico.

Los suministros claves incluyen el complejo preformado receptor:reland, o cada agente separadamente, para su uso en los ensayos heterogéneos y homogéneos enseñaron aquí dentro o en el diagnóstico *en vivo* o métodos terapéuticos de tratamiento. El complejo receptor:reland puede formarse previamente poniendo en contacto la muestra con el complejo por incubación del receptor con el reland por un período apropiado de tiempo.

Un aspecto esencial de la invención es la selección del reland para formar complejos que tengan propiedades que son substancialmente diferentes de las propiedades de los complejos ligante:receptor descritos en la técnica anterior competitiva o ensayos disociativos. Como la formación de un complejo conveniente receptor:reland depende de las características del reland, es apropiado en este punto presentar algunas de estas características. Más aún y más detalles serán presentados debajo.

El reland se relaciona estructuralmente con el analito y en la forma monomérica demuestra menos del 1% de reactividad cruzada de ligar al receptor un efecto que parecería ser incoherente con la habilidad de formar un complejo estable, en contraste directo a los ensayos y complejos de la técnica anterior, el reland no compite perceptiblemente con el analito para ligar al receptor. Preparando el complejo, hemos encontrado que el reland monomérico se asocia con el receptor sólo a concentraciones altas del reland (pueden usarse concentraciones más bajas cuando el reland se presenta como un multímero) y esto se hace con cinéticas lentas y sólo en ausencia del analito. El reland no afecta perceptiblemente la liga completa esencial del analito al receptor ni hace que éste ligue al receptor en la presencia de analito. La constante de asociación del reland monomérico y el receptor es menos de o igual a aproximadamente 10^5 M^{-1} , preferentemente 10^3 a 10^5 M^{-1} y más preferentemente alrededor de 10^4 M^{-1} . Cuando es acomplejado al receptor como un multímero, como por ejemplo, cuando el reland es un dimer, trimer o -mer más alto, o cuando conjugó a un portador como un péptido (todavía un multímero como es usado aquí), la constante de asociación aumenta dramáticamente. Se prefiere no exceder un peso molecular total para el reland mayor que 5,000 Daltons si la liberación óptima es un objetivo, sin embargo, esto es por la razón de que tamaños mayores de la molécula tienden a favorecer la formación de complejos irreversibles con el receptor y favorecen una reactividad cruzada mayor con el analito. Sin embargo, cuando el complejo se forma en o cerca del tiempo de ejecución del ensayo, de tal forma que la irreversibilidad del complejo no es un factor, los multímeros de peso molecular más alto como los que se obtienen de BSZ, BCT, G6PH, y otros llevaron a complejos de liberación adecuados con parámetros de reactividad cruzada aceptables.

En un aspecto favorablemente preferido de la invención, el peso molecular del reland es menor que 5000 Daltons, y más preferentemente, menos de 2000 Daltons. El peso molecular del reland para los propósitos de la invención incluye el epítopo que dirige la liga con el receptor, así como cualquier montador, marcas o estructuras auxiliares del reland. Proporcionando un método de obtener un reland de tamaño pequeño, la presente invención ayuda a asegurar que la formación de un complejo irreversible entre el reland y el receptor se evite. Esto es especialmente importante porque limitó el suministro de un complejo preformado en un conjunto. No obstante, cuando es preparado en el sitio o justamente antes del uso, el complejo actúa adecuadamente como un complejo de liberación.

Teóricamente, diseñando el complejo, uno podría escoger modificar el reland o el sitio aglutinante del receptor. Pero en la práctica, es mucho más factible modificar el reland. Hay una variedad amplia de receptores disponible para usar en la invención como se describirá *infra*.

Los métodos de diagnóstico de la presente invención usando complejos identificados proporcionan sorprendentemente mayor sensibilidad, especificidad, exactitud y rango de detección que los ensayos de asociación convencional o los ensayos de disociación competitiva tal como está descrito en Freytag EE.UU. Patente No. 4,551, 426.

Los analitos pueden ser cualquier antígeno o molécula blanca como fue descrito aquí incluyendo drogas terapéuticas y metabolitos de ellas, drogas ilícitas y metabolitos de ellas, esteroides, y hormonas del péptido, hormonas, por ejemplo, insulina, antígenos virales, antígenos bacterianos, proteínas del suero, anticuerpos, toxinas, pesticidas, productos medioambientales, antígenos del cáncer, marcadores genéticos, o cualquier antígeno de interés donde se desea la detección de la presencia (o ausencia) del analito en un ensayo rápido, específico, sensible

Definiciones

Analito--molécula de interés en un ensayo o en un sitio en el cuerpo; también el blanco del receptor.

Reland--una palabra abreviada del término "release ligand" que describió las propiedades liberadoras del ligante cuando es acomplejado, una molécula capaz de ligar a un receptor y que demuestra las siguientes propiedades:

- el reland puede ser monomérico o puede estar en forma multimérica como el dimer, el trimer, 4 -, 5 -, 6-mer o -mer más altos de la molécula monomérica; "multímero" también incluye conjugaciones del reland a un portador tal como péptido, azúcares, polímeros, y similares;

- la constante de disociación del reland y el receptor es tal que ninguna descarga apreciable de reland ocurre en la ausencia de analito para el receptor;

- la constante de disociación del complejo reland-receptor es extremadamente baja, tal que el analito inducido liberado del reland no es dependiente de o relacionado a la velocidad de disociación del complejo estable;

- el reland se relaciona estructuralmente al analito en forma monomérica, pero tiene menos del 1% de reactividad cruzada con el receptor, y más preferentemente, no hace perceptiblemente reacción cruzada o compite con el analito por ligar al receptor;

- 5 - la descarga del reland desde el complejo receptor:reland es inducida por el analito;
- el reland se asocia con el receptor con cinéticas lentas en la ausencia del analito;
- preformando el complejo, no hay aglomeración apreciable del reland monomérico al receptor hasta que la concentración del reland es aproximadamente 10^{-5} M, preferentemente 10^{-3} a 10^{-4} M o a concentraciones menores, por ejemplo 10^{-5} y más bajas (10^{-6} a 10^{-8} o mayores) cuando el reland está en la forma de multímeros. Las concentraciones del receptor normalmente están en el rango desde 10^{-6} a 10^{-1} M, pero pueden emplearse valores fuera de ese rango;
- 15 - el monómero (o multímero) del reland liga al receptor con una afinidad substancialmente menor que la del analito ligando al receptor, pero el complejo receptor:reland tiene una constante de disociación similar a la de los complejos receptor:analito.

20 Receptor--un socio aglutinante específico del analito; y molécula capaz de ligar específicamente al analito o al reland como fue descrito aquí. En cada caso, se forma un complejo estable, pero la constante de asociación del analito es superior que la del reland. Un receptor preferido es un anticuerpo, pero otros socios aglutinantes específicos, como los descritos aquí, también se contemplan por la invención.

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1. Fórmula Molecular. Fig. (A) nicotina, (B) cotinina, (C) N-isopropil-4-carboxil-narcotinina y (D) N-propil-4-carboxil-narcotinina.

30 Figura 2. Ensayo de descarga formato ELISA para cotinina muestra la descarga del cis-hidroxicotinina inmovilizado G-6-PDH (asteriscos); N-isopropil-narcotina G-6-PDH (signos más); N-propil-narcotinina G-6-PDH (cuadrados abiertos)

35 Figura 3. Comparación de las curvas de respuesta de dosis de un formato tipo de ensayo Emit homogéneo de una técnica anterior (signos más) para la cotinina con un ensayo de descarga de la invención para la cotinina (cuadrados).

Figura 4. Curva de respuesta de dosis del ensayo de descarga homogéneo de la presente invención para la cotinina.

40 Figura 5. El anticuerpo monoclonal a la hemoglobina glicada liga a la hemoglobina no glicada y a la hemoglobina glicada (HbGlc) en un ensayo Elisa convencional.

Figura 6. Comparación de la habilidad de la hemoglobina noglicada (HbAo) y la hemoglobina glicada (HbGlc) para liberar relands desde el anticuerpo monoclonal hasta la hemoglobina glicada.

45 Figura 7. Comparación del convencional con el Formato de Ensayo de Descarga en la habilidad del anticuerpo monoclonal a la hemoglobina glicada para diferenciar entre la hemoglobina glicada (HbGlc) y la hemoglobina no glicada (HbAo).

Figura 8. (Figs. 8A, 8B, 8C) Cinéticas de aglutinantes de antiteofilina monoclonal al ligante teofilina conjugado a la biotina (carboxipropil-dimetilxantina-biotina) y al reland de teofilina-biotina (teobromo-1-acetato-biotina).

50 Figura 9. Cinéticas de descarga para el ligante-biotina, 9A, carboxipropildimetilxantina-biotina y reland-biotina, 9B (teobromo-1-acetato-biotina).

Figura 10. Reactividad cruzada del teobromo y teobromo-1-acetato en un Elisa competitivo para la teofilina.

55 Figura 11. Dependencia de la concentración del reland de teofilina (teobromo-1-acetato-biotina) formación del receptor (cuadrados) comparado al del ligante del teofilina (carboxipropildimetilxantina) formación del receptor (rombos).

60 Figura 12. Evaluación de la habilidad de candidatos del reland de piridinolina (es decir los Análogos de la Piridina) para ligar la anti-piridinolina en el formato Elisa.

Figura 13. Formato Elisa, descarga del piridoxal biotinolado (Reland Piridinolina) desde la anti-piridinolina por la Piridinolina.

65

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención aplicada a diagnósticos *en vitro*, se provee un método para detectar la presencia del analito en una muestra, usando complejos identificados del receptor:reland y equipos para eso. Una muestra de prueba puede ser cualquier fluido sospechoso de contener el blanco del analito, tal como leche, agua, orina, sangre, suero, saliva, exudado corporal, y similares, y los líquidos derivados de materiales sólidos de interés tales como suelo, alimentos, productos químicos, el tejido del cuerpo, y similares. La descarga, método de ensayo de la invención involucra el contacto de una muestra de prueba con un complejo receptor:reland y, si el analito está presente, detectando la descarga del reland (o el receptor liberado) desde el complejo o detectando la liga del receptor al analito en los casos apropiados.

Se cree que la reacción de descarga ocurre cuando el analito contacta al complejo receptor:reland formando un complejo tri-molecular putativo. La presencia del analito con una constante de asociación con el receptor mayor o igual a 10^8 M^{-1} (por ejemplo 10^9 , etc.) induce un cambio en el complejo receptor:reland que cambia la constante de disociación del complejo permitiendo la descarga del reland. Esta interacción del analito con el receptor puede ser en un sitio aglutinante del reland o en un sitio aglutinante alostérico. Después de la descarga o reland, el complejo del analito y receptor no es afectado perceptiblemente por la presencia del reland libre. El reland o el receptor pueden ser detectados después de la descarga desde su complejo inicial para indicar la presencia del analito en la muestra. El método de ensayo de la invención puede realizarse en los formatos homogéneos o heterogéneos. Los detalles específicos de cada formato se proporcionan debajo.

Un ensayo de descarga de la presente invención permite la preparación de un complejo en que el sitio o los sitios ligantes en el receptor y el reland están presentes en concentración aproximadamente igual, es decir, formación cuantitativa del complejo, aunque esto no es esencial. Teniendo cada elemento presente en igual concentración se refuerza la sensibilidad, porque si el receptor está presente en exceso, puede ligar al analito sin liberar al reland desde el complejo.

A fin de lograr un complejo receptor:reland en que el número de sitios aglutinantes de cada elemento esté presente en cantidades sustancialmente equimolares, el receptor y el reland se incuban por lo menos una hora antes de exponer la muestra, aunque tiempos de incubación más cortos son posibles si cualquier reactivo está presente en un vasto exceso sobre el otro. Preferentemente el tiempo de incubación es mayor que aproximadamente doce horas. Un tiempo de incubación largo permite la formación de complejos más estables durante la descarga repetida y las reacciones de aglomeración cuando un elemento, receptor o reland, están presentes en exceso. Después de que esta reacción de aglomeración de baja afinidad alcanza el equilibrio, el complejo receptor:reland, ahora estable, siguiendo una incubación a largo plazo, se aísla del reactivo en exceso (reland o receptor). El aislamiento del complejo puede ser logrado por precipitación, cromatografía exclusión de tamaño, centrifugación gradiente de densidad, micro-filtración, u otras técnicas para separar complejos desde sus componentes. Alternativamente, para evitar una etapa de separación, el receptor y el reland pueden mezclarse en iguales concentraciones en el sitio aglutinante o en ligero exceso (aproximadamente 1 - a 2-veces) del reland e incubados por un tiempo que depende de la concentración del reland para permitir la aglomeración sustancialmente cuantitativa como complejos estables. Por ejemplo, (Fig. 8C) a concentraciones del reland de 0.25 ug/ml, se requirió una incubación de una semana o más. La formación del complejo reactivo:reland se discute más totalmente, debajo. Para superar el costo de proporcionar un marca del reland a concentración alta y como consecuencia separar el limitado y el libre, el reland puede ser polimerizado a la forma de multímero. En tal forma, la aglomeración irá al completamiento a niveles estequiométricos del receptor y del reland.

Los métodos de la presente invención están basados en el descubrimiento de la descarga del reland desde un complejo del receptor y el reland en presencia del analito que está incluido en él mismo. El reland liberado no reasocia con el receptor y, por consiguiente, no compite con el analito por sitios aglutinantes en el receptor. Se piensa que este resultado es causado al menos en parte como consecuencia de la constante de asociación de ligar del reland al receptor la cual para el reland monomérico es aproximadamente 10^3 M^{-1} y preferentemente 10^4 a 10^3 M^{-1} .

La descarga del reland desde el complejo receptor:reland en la presencia del analito es llamada aquí la reacción de descarga. Es significativo destacar que la descarga es casi completa (esto es, esencialmente todo el reland es liberado) dentro de segundos a minutos después que el analito contacta al complejo. El reland libre no reasocia con el receptor dentro del horario del análisis, prueba, o método. Mientras se ha postulado que el corolario para la descarga del reland es que el receptor libre se combina con el analito para formar un complejo estable, esto no es necesario en la invención para que eso ocurra. La cantidad de reland liberado es directamente proporcional a la cantidad de analito encontrada por el complejo reland:receptor y, así, una medida de la cantidad de reland liberado es una medida de la cantidad de analito presente.

Aunque no se piensa que esté limitado por cualquier hipótesis particular para un mecanismo de la reacción de descarga, se cree, basado en las cinéticas rápidas de la reacción de descarga a pesar de la estabilidad del complejo receptor:reland, y la no-dependencia del resultante de la descarga del reland sobre la velocidad de disociación del complejo receptor:reland, que un complejo tri-molecular entre el receptor; el analito, y el reland se forma cuando el analito está presente. Debido a la alta afinidad del analito por el receptor, y la inestabilidad relativa del complejo tri-molecular, el reland se libera, permitiendo al analito formar complejo con el receptor. Como el reland no compite perceptiblemente con el analito por ligar al receptor, el complejo del analito y el receptor no se afecta notoriamente por la presencia del reland. Esta hipótesis también es consistente con la existencia de un sitio aglutinante doble en el receptor.

La constante de asociación de ligar del receptor al reland monomérico no será mayor de aproximadamente el 1%, y más preferentemente no más de aproximadamente 0.2%, de la constante de asociación de ligar del receptor al analito. Esto puede observarse cualitativamente como aglomeración relativa, es decir, por actividad aparente en un ensayo.

Como la reacción de descarga depende de una asociación de alta afinidad del receptor y el analito, ésta es sensible y específica. Es decir, el receptor ligará concentraciones bajas del analito. La dependencia de la reacción de descarga de la afinidad aglutinante diferencial incrementa además la especificidad. El receptor no disociará y se ligará con análogos reactivos cruzados del analito a menos que la constante aglutinante sea mucho más alta que la constante aglutinante del receptor y el reland.

Una de las ventajas significativas de la relación entre el analito y el reland según la presente invención es que la proporción eficaz de analito al reland para incluir la reacción de descarga sea menos de 100:1, preferentemente menos de 10:1, y más preferentemente aproximadamente 1:1. De hecho, una proporción 1:2 induce una descarga casi completa y estequiométrica. Esta característica de los ensayos de la invención es significativamente diferente de los métodos de disociación de la técnica anterior, en la cual la proporción de analito necesitada para liberar al análogo del analito (el cual es reactivo cruzado con el analito) es substancialmente mayor que 100:1, ya que es dependiente de la K_d del ligante del receptor.

Es importante enfatizar que una porción eficaz del complejo receptor:reland debe liberarse en la presencia del analito, y muy poco debe liberarse en la ausencia del analito, o el ruido "de fondo" en el sistema será un factor considerable. Por ejemplo, si sólo el 1% del complejo receptor:reland fuera liberado, el 99% del sistema no sería afectado. Si la desviación estándar de la medición fuera el 1% (equivalente a $99 \pm 1\%$), lo cual representa un excelente coeficiente de variación en los sistemas de inmunoensayo, entonces el efecto del 1% de la descarga sería $1\% \pm 1\%$, anulando cualquier efecto significativo. El presente ensayo mantiene una disociación significativa del complejo receptor:reland, es decir, descarga por encima de los niveles básicos.

La descarga estequiométrica del reland también provee la oportunidad para un rango amplio de concentración por encima del cual los analitos pueden ser detectados. En los sistemas competitivos de la técnica anterior, el diseño del ensayo requiere el uso de cantidades limitadas del ligante para detectar pequeñas cantidades del analito en una muestra. Tal configuración se sumergiría fuera por una gran cantidad de analito sin embargo, Contrariamente, donde se esperan niveles altos del analito, se requieren cantidades mayores del análogo del analito. Bajo estas condiciones, la disociación básica sería casi igual a, o incluso excede, la disociación en la presencia de una cantidad pequeña del analito. En concordancia, la invención instantánea supera estas deficiencias de la técnica anterior proporcionando el complejo preformado receptor:reland, estable en la ausencia de analito, aún potencialmente cuantitativamente posible a descargar en la presencia del analito.

La cantidad de reland liberado, mientras potencialmente cuantitativo, puede afectarse por el sistema. Por ejemplo, en un sistema heterogéneo, cuando un complejo en fase sólida del anticuerpo marcado con peróxido del rábano picante para la cotinina como receptor y el isopropilnarcotinina como reland, unido a una proteína portadora (por ejemplo, dehidrogenasa de glucosa-6-fosfato) para facilitar la aglomeración a la fase sólida, se hace reaccionar con la muestra, 5-10% del anticuerpo total es liberado por el analito. El porcentaje exacto es difícil de determinar ya que se conoce que la actividad de la enzima en una fase sólida es menor que la de la enzima en la fase líquida. En un ensayo de descarga homogéneo, usando los mismos reactivos, la muestra que contiene cotinina induce 100% de inversión de la inhibición de la enzima, lo cual indica 100% de descarga. Esto indica que la menor descarga vista en el sistema de fase sólida, es una función del sistema, no del complejo reland:anticuerpo.

Otras ventajas de la presente invención pueden ser rápidamente apreciadas por aquellos de experiencia normal en la técnica. La reacción de descarga es relativamente instantánea, generalmente 5 minutos hasta el punto final. La difusión de los reactivos es un factor controlador en el tiempo necesario para el ensayo. Así, los tiempos pueden acortarse aumentando la concentración de los reactivos. Más ventajosamente, la reacción de descarga no requiere un sistema de detección altamente sensible. Esto significa que la presente invención se aplica para ensayos simples, usando compuestos perceptibles de baja sensibilidad como los cofactores, tintes, y similares, en lugar de los fluoróforos de alta sensibilidad, y así evita la necesidad para un complicado-y caro- aparato de detección como el requerido en los ensayos de disociación competitivos en la técnica anterior.

El complejo receptor:reland

Un ensayo de descarga eficaz requiere el uso de un complejo receptor:reland estable. Este complejo se forma más lentamente que los complejos convencionales, por ejemplo, los complejos receptor:analito y anticuerpo:antígeno, etc. (Fig. 8A, 8b, 8C). Este complejo se prepara en un medio líquido acuoso vía incubación del reland y el receptor durante un tiempo que depende de la concentración de los reactivos. A concentraciones molares más altas, se requieren tiempos más cortos. La descarga del complejo ocurre rápidamente durante la formación inicial del complejo receptor:reland. Sin embargo, después de un periodo de incubación conveniente, normalmente mayor que una hora, y más a menudo mayor que 123 horas, el complejo del receptor:reland se hace estable. Normalmente, las temperaturas de 4 grados C a 40 grados C serían convenientes siendo preferible con 4 grados a temperatura ambiente.

La estabilidad del complejo es en parte una función del diseño del reland y el tiempo de incubación del reland y el receptor. El tiempo de incubación apropiado es rápidamente determinado para cada combinación receptor y reland.

Sin embargo generalmente, el receptor y el reland deben incubarse por lo menos una hora, y preferentemente más de 12 horas, previo a la exposición al analito.

Bajo condiciones apropiadas, por ejemplo, la presencia de sales como el cloruro de sodio, o agentes estabilizadores tales como proteínas o glucosa, o ambos, el complejo estable receptor:reland permanecerá siendo posible de descargar por un período de tiempo largo-días, semanas o más. Según la presente invención, un complejo estable receptor:reland puede estar en solución, o puede ser secado. Un complejo formado en la presencia de cloruro de sodio al 5% podría usarse seis días después de que el complejo receptor:reland se preparó. También pueden usarse proteínas, azúcares u otros estabilizadores conocidos para estabilizar un complejo seco receptor:reland.

Aunque la presente invención no está limitada por cualquier teoría o hipótesis, se cree que la formación de un complejo estable receptor:reland soporta un modelo de alojamiento molecular entre el reland y el receptor. El equilibrio de esta aglomeración favorece una configuración del complejo que lo estabiliza, significando que la afinidad efectiva del complejo puede, y probablemente debe ser, superior en el complejo maduro que en el complejo inicial. Esto se refleja en una velocidad de disociación más lenta del complejo.

Según la invención, el reland se designa preferentemente con un sistema de detección, o una parte de él. Alternativamente, el marcador puede incorporarse en el receptor, también se contempla por la invención suministrar una porción de un sistema marcador para el reland y proporcionar el resto del sistema marcador en el medio ambiente de la prueba. Las dos porciones se combinan después de la descarga del reland designado para formar el sistema de detección indicador. Por ejemplo, el reland puede ser marcado con FAD, que es la porción de glucosa oxidada que da actividad a la enzima. Cuando el FAD-reland es acomplejado con el receptor, el FAD no está rápidamente disponible a la glucosa oxidada (llamada "apoglucosa oxidada" o apoGO cuando el FAD está ausente). Cuando el FAD:reland se libera por el contacto con el analito apropiado, el FAD se incorpora fácilmente en la apoglucosa oxidada proporcionado en el sistema de prueba, activa el mismo y se detecta como una medida de la presencia de cantidad de analito.

Receptores

Un elemento del complejo receptor:reland es un receptor que tiene uno o más sitios aglutinantes capaces de específicamente ligar al analito, en el cual la constante de asociación del aglutinante es alta. Preferentemente, la constante de asociación es mayor que 10^8 M^{-1} , y más preferentemente mayor que 10^{10} M^{-1} . El receptor también es capaz de aglutinar al reland monomérico con una constante de asociación de ligar relativamente baja comparado con la constante para el receptor ligar al analito. Los receptores convenientes para usar en los ensayos de descarga de la invención incluyen anticuerpos o un fragmento del anticuerpo que contiene los sitios aglutinantes para el analito y el reland, o cualquier otra molécula o macromolécula capaz de ligar específicamente y formar un complejo estable con ambos un reland y un analito. Se prefieren anticuerpos y receptores de célula superficial, con los anticuerpos más preferidos. Más preferidos son los anticuerpos generados para un epítipo específico, es decir una droga o el péptido pequeño conjugado a una molécula inmunogénica como una proteína, ácido poli amino (por ejemplo poli lisina) agarosa u otros derivados poliméricos. En una realización preferida, el receptor se genera o selecciona para ser específico para el epítipo más único sobre el analito.

En una realización específica, *infra*, en que el receptor es un anticuerpo, el anticuerpo se selecciona por su especificidad para un único epítipo en el analito, por ejemplo, el sitio de glicación de hemoglobina glicada, o una secuencia única de una proteína o polipéptido.

Varios procedimientos conocidos en la técnica pueden usarse para la producción de anticuerpos para analitos de interés. Tales anticuerpos incluyen pero no se limitan al policlonal, monoclonal, imaginario, cadena simple, fragmentos Fab y un Fab de estudio expreso. Para la producción de anticuerpos, varios animales huéspedes pueden ser inmunizados por inyección con un analito particular o analito conjugado a un portador inmunogénico, incluyendo pero no limitado a conejos, ratones, ratas, etc. Varios ayudantes pueden usarse para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies huéspedes incluyendo pero no limitada a las de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como el hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activa como liso lecitina, polioles del plurónico, polianiones, pépticos, las emulsiones de aceite, la hemocianina, dinitrofenol, y potencialmente los ayudantes humanos útiles como BCG (el bacilli Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos monoclonales para analitos pueden ser preparados usando cualquier técnica que suministra para la producción de anticuerpos moléculas para líneas de celda continua en cultura o *en vivo*. Éstos incluyen pero no están limitados a la técnica hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein, (Nature, 1975, 256:495-497), la más reciente técnica del hibridoma humano célula B (Kosbor y otros, 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole y otros, 1985, Anticuerpos Monoclonales y Terapia del Cáncer, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). En una realización adicional de la invención anticuerpos monoclonales específicos al analito pueden producirse en animales libres de germen- que utilizan la tecnología reciente PCT/US90/02545). Según la invención, anticuerpos humanos pueden usarse y pueden obtenerse usando hibridomas humanos (Cote y otros, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci., 80:2026-2030) o transformando las células B humanas con el virus EBV *en vitro* (Cole y otros, 1985, en Anticuerpos Monoclonales y Terapia del Cáncer, Alan R. Liss, pp. 77-96). De hecho, según la invención, las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos imaginarios" (Morrison y otros, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855; Neuberger y otros, 1984, Nature, 312:604-608; Takeda y otros, 1985, Nature, 312:452-454) empalmando los genes de

una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad del antígeno apropiada junto con los genes de la molécula de un anticuerpo humano de actividad biológica apropiada puede usarse. Tales anticuerpos están dentro del alcance de esta invención.

Según la invención, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simple (Patente americana 4,946,778) puede adaptarse para producir anticuerpos de cadena simple específicos para el analito. Una realización adicional de la invención utiliza las técnicas descritas para la construcción de Fab expresión de estudio (Huse y otros, 1989, Science, **246**,:1275-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos del monoclonal Fab con la especificidad deseada para analitos.

Los fragmentos del anticuerpo que contienen sitios específicos para analitos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen pero no se limitan a: los fragmentos $F(ab')_2$ que pueden producirse por la digestión de la pepsina de la molécula del anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes del disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$

Alternativamente, el anticuerpo policlonal o monoclonal específico para un analito de interés puede obtenerse desde fuentes comerciales.

Pueden purificarse receptores para ligar al analito, por ejemplo, por cromatografía de afinidad. El anticuerpo monoclonal también puede purificarse por la proteína A o cromatografía anti-Ig. Las técnicas para purificar anticuerpos policlonales y monoclonal son bien conocidas en la técnica. Una preparación del receptor heterogéneo, tal como el anticuerpo policlonal, también puede absorberse con una concentración baja (por ejemplo, 1% de la concentración del receptor) del reland para remover cualquier receptor capaz de ligar al reland con afinidad alta.

Reland

En la elucidación adicional de las propiedades partiendo de las Definiciones, como es usado aquí el término “reland” incluye las moléculas con reactividad cruzada limitada con el analito para ligar al receptor. El término “reland” se usa aquí intercambiado con ligante liberador, pues reland es un término abreviado designado por los co-inventores aquí para referirse a un ligante liberador. El ligante liberador o reland liga con el receptor con una constante de asociación baja, y no afecta la estabilidad de un complejo analito:receptor. Así, un reland está estructuralmente relacionado a su analito del cognado para permitir una interacción aglutinante específica, pero también incluye suficientes diferencias estructurales para bajar la afinidad y evitar la formación de complejos limitados irreversibles. De acuerdo con ello, un reland puede ser un análogo del analito, incluso un epítopo del analito, un derivado del analito, un analito modificado, o un isómero del analito. Preferentemente, el reland difiere estructuralmente del analito en una ubicación a o cerca del epítopo. Estas diferencias pueden incluir modificaciones químicas, esteéricas, de configuración, de conformación, o cambios iónicos. Preferentemente, se sustituyen los grupos iónicos con grupos polares neutros, ya que las interacciones iónicas son particularmente fuertes, y pueden interferir con la descarga.

Moléculas preparadas para imitar estructuralmente al analito también son análogas para usar como relands. Tales imitaciones estructurales pueden ser, pero no necesariamente, de la misma naturaleza química que el analito tanto como el epítopo es químicamente similar. Así, por ejemplo, como se muestra en ejemplos específicos, debajo, un péptido puede ser un análogo de una proteína. Una vez un par analito/receptor para investigación ha sido escogido relands potenciales se seleccionan de los análogos del analito. Los análogos del analito pueden seleccionarse identificando las estructuras similar al analito, seleccionando algunos con porciones diferentes de la molécula teniendo que ser modificadas como se enseñó aquí y mirando la reactividad cruzada de tal estructura en un ensayo competitivo para el analito como previamente se indicó. La modificación puede en algunas circunstancias ser sólo cambios simples o sustituciones en la estructura, tal como una etapa de disociación o sustitución de un solo aminoácido en una cadena del polipéptido. De esos compuestos monoméricos con reactividad cruzada de menos de 1% preferentemente menos de 0.1% y más preferentemente ninguna reactividad cruzada a concentración 10^{-6} M, algunos se seleccionan para discriminar por su habilidad de ligar establemente al receptor. Para evaluar el enlace estable, un método preferido es conjugar los relands potenciales a la biotina, inmovilizar el receptor sobre una placa Elisa, y probar la habilidad del reland-biotina de ligar al receptor que usa el conjugado peroxidasa del rábano picante a la avidina. De aquellos que exhiben enlace estable, algunos se seleccionan para determinar cuál es liberado y es estable en el tiempo.

Si ningún análogo está comercialmente disponible, los derivados pueden ser preparados agregando o eliminando grupos modificando al analito. Los derivados también pueden ser productos metabólicos naturales o el analito. Uno de experiencia común, teniendo la información presentada aquí, sabrá rápidamente cómo preparar o identificar derivados de analitos para usar en la invención. Los cambios en la estructura molecular del analito alterarán la afinidad aglutinante del receptor por el reland, o grupos voluminosos pueden reforzar la habilidad a largo plazo de liberar el reland.

El analito modificado incluye analito conjugado con un grupo esteárico interfiriendo. La adición de grupos voluminosos, tales como moléculas alifáticas, aromáticas o cíclicas o azúcares, o grupos iónicos, o preferentemente la sustitución de grupos no-iónicos por iónicos, a un analito o a un péptido puede resultar en una afinidad aglutinante disminuida para el receptor debido al esteárico y/o interferencia de carga. Alternativamente, la unión con un grupo voluminoso puede causar un cambio en la conformación del epítopo del reland que disminuye la afinidad aglutinante con el receptor. Las modificaciones químicas de moléculas orgánicas son muy conocidas en la técnica y puede usarse para modificar el reland. Por ejemplo, un analito, la cotinina, puede modificarse por la presencia de grupos alquilo

que tienen hasta 6 átomos de carbono y más preferentemente, grupos N-iso propilo o N-propilo para proporcionar un reland preferido en un ensayo para la cotinina (Fig. 1).

Los isómeros de analitos son moléculas con la misma composición pero diferente configuración. Típicamente, los isómeros tendrán una configuración diferente en un centro de un carbono particular, por ejemplo, *cis versus trans*, *D versus L*. Los isómeros incluyen diastereómeros que tienen la configuración opuesta a uno o más centros imaginarios, e incluyen enantiómeros de analitos. Como las interacciones de enlace biológicas dependen de la configuración así como de la estructura y composición, el uso de un isómero como reland puede resultar en una afinidad aglutinante mucho menor para los receptores. Normalmente una disminución sola en la afinidad entre los isómeros no es suficiente para crear un reland, pero un isómero puede reforzar el efecto de otras alteraciones.

Donde el analito es una proteína, el reland puede prepararse sintetizando análogos del péptido del epitope para el cual el receptor es específico. Métodos de recombinación de DNA que usan un sitio dirigido u otras técnicas de muta-génesis para alterar la sucesión del aminoácido de la proteína también pueden usarse. Estas técnicas se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. (por ejemplo, vea Zoller y Smith, 1984, DNA 3:479-488; Oliphant y otros, 1986, Gene 44:177; Hutchinson y otros, 1986, Proc. Nat'l. Acad. Sci. E.E.U.U. 83:710). Las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se prefieren para el sitio dirigido de la muta génesis (vea Higuchi, 1989, " Usando PCT para Ingeniería DNA," en la Tecnología PCR:Principios y Aplicaciones para la Amplificación de DNA, H. Erlich, ed. Stockton Press, Capítulo 6, pp. 61-70). Preferentemente, tal como una proteína expresa para recombinación es fragmentada, por ejemplo, por digestión con un peptidasa, para dar más preferentemente. porciones del reland con peso molecular de menos de aproximadamente 5000 Daltons Más preferentemente, el reland para una proteína puede ser un péptido con peso molecular de menos de 2000 que se prepara sintéticamente.

El reland también puede comprender un grupo de enlace. Un grupo de enlace puede usarse para conjugar un marcador al reland, por ejemplo, un agente de enlace cruzado di funcional para facilitar la unión del marcador al reland donde los grupos funcionales del reland y el marcador no admiten atadura directa. Un ejemplo de un grupo de enlace es el ácido amino capríco. También, los grupos de enlace voluminosos pueden usarse para impedir esteáricamente la liga del reland al receptor. Un ejemplo de un grupo de enlace voluminoso es el ácido p-aminobenzoico. Ambos, los grupos de enlace y los marcadores, pueden disminuir o aumentar la constante de asociación y/o disociación. Por consiguiente, la selección de un reland requiere evaluación del reland total incluyendo grupo de enlace y marcador.

Los relands pueden evaluarse para mostrar su conveniencia para su uso en un ensayo de descarga. Los ensayos de evaluación del reland incluyen ensayos competitivos, ensayos de reforzamiento del ligante, ensayo directo y ensayos de descarga sobre una placa de micro-valoración, así como el ensayo de descarga contemplado por sí mismo. El fin de tales ensayos es demostrar que el reland puede formar un complejo estable con el receptor, que el reland no afecta perceptiblemente un complejo del analito y el receptor, que el analito induce la descarga del reland desde un complejo estable del analito y el receptor, que el reland no induce significativamente la descarga de un complejo estable del reland y el receptor, que el reland no hace significativamente, y preferentemente no compite perceptiblemente con el analito por ligar al receptor. Estas características del reland pueden mostrarse cuantitativamente, midiendo el porcentaje de descarga, las constantes de afinidad, y similares, o cualitativamente, midiendo la descarga perceptible y las actividades relativas de liga.

Los ensayos competitivos útiles para evaluar el potencial del reland pueden realizarse en un formato ELISA, pero una técnica de ensayo competitivo puede usarse. Por ejemplo, un reland es mucho menos efectivo que el analito para inhibir la liga del receptor al analito en una fase sólida. Una molécula que es un inhibidor competitivo pobre relativo al analito puede ser una buena opción para usar como reland.

Una concentración baja de un reland conveniente puede realmente parecer reforzar la liga del receptor al analito en un ensayo competitivo. Así en un ensayo del tipo competitivo una señal absoluta incrementada en presencia de una concentración baja del candidato a reland indica que el candidato puede ser un reland adecuado (Vea Figura 10).

Cuando un ensayo directo se usa para evaluar un reland potencial, la liga del receptor y el reland se compara a la liga del receptor y el analito. Un formato ELISA está bien-adecuado para este tipo de ensayo, pero otros formatos de ensayo también pueden ser usados. Un reland monomérico demostrará no más de aproximadamente 1%, y preferentemente menos de aproximadamente 0.2%, de la actividad aglutinante del analito. Típicamente, en una prueba ELISA, la actividad aglutinante se representa por la valoración, es decir, dilución o concentración del receptor con una actividad aglutinante particular. Alternativamente, la actividad específica a la misma concentración del receptor puede ser comparada.

El método de evaluación de un reland sobre una placa de micro-valoración aprovecha la ventaja de la habilidad de las estructuras multiméricas del reland para exhibir la constante de asociación aumentada. Cuando la placa de micro-valoración está recubierta con el candidato potencial a reland conjugado a la proteína, el anticuerpo marcado complementario se agrega y se permite formar un complejo. Si el reland es adecuado, ocurrirá la descarga del anticuerpo designado desde el complejo y puede detectarse en la muestra que sobrenada después que se agrega la muestra conteniendo el analito. Un formato de placa para micro-valoración se usa para discriminar entre los relands potenciales debido a su facilidad. Para discriminar rápida y fácilmente los relands potenciales, las placas de micro-valoración son previamente recubiertas con albúmina a una concentración de 2 ug/ml. Varios candidatos a reland soportando grupos -COOH o -NH₂ se adicionan con la carbodiimida a los pozos y permiten interactuar con la albúmina durante la noche.

ES 2 265 646 T3

Después de lavar la placa recubierta-reland ésta puede ser ensayada, primero para evaluar su habilidad de ligar el anticuerpo, y después por su habilidad de liberar. En este formato, es posible discriminar entre docenas de candidatos a reland rápidamente y simplemente por un día o así.

5 *Formato de ensayo de descarga*

El ensayo de descarga que comprende receptor, reland y un medio para detectar el reland liberado o receptor (cuando se desea detectar el receptor liberado) proporciona un método rápido, fácil, y barato de detectar analitos.

10 Los analitos generalmente pueden ser aquellos descritos previamente aquí. Realizaciones específicas se dirigen a la teofilina, la hemoglobina glicada, productos metabólicos o nicotina tales como la cotinina, y productos del hueso del péptido con terminales C- y N- y producción de colágeno como telopéptidos y piridinolinas especialmente convenientes en monitorear la osteoporosis.

15 El método de ensayo de la presente invención es un ensayo directo que rinde un resultado positivo en detectar la disociación de un complejo receptor:reland. Esto es; la presencia de un analito para el receptor resulta en la descarga del componente designado como un evento positivo en lugar de ningún evento o un evento negativo como en los ensayos de técnicas anteriores. Una correlación positiva es ventajosa porque es una satisfacción psicológicamente que la presencia de una señal o el aumento en la intensidad de la señal indica presencia de analito en una muestra. Los
20 resultados obtenidos por métodos de ensayo en los cuales la detección de la señal disminuye cuando el analito está presente son susceptibles a interpretaciones erróneas. Es aconsejable emplear un ensayo, tal como el de la presente invención, en el cual solamente un resultado positivo genera una señal. Los ensayos de la invención son igualmente convenientes para el uso tanto en un laboratorio por personal técnico como fuera de un laboratorio por ambos el personal técnico y no-técnico.

25 Preferentemente en un ensayo de descarga heterogéneo, el reland se designa para que en la descarga en presencia del analito, el reland-marcador esté separado de los productos de la reacción y el marcador detectado. En un ensayo de descarga homogéneo, mientras se prefiere que el reland sea marcado, bajo ciertas circunstancias el receptor puede en cambio marcarse. Por ejemplo, un marcador fluorescente puede usarse en el receptor, en tal caso el reland
30 puede contener un apagador fluorescente. En el complejo receptor:reland, la señal fluorescente se apaga entonces, y no hay fluorescencia perceptible hasta que ocurre la descarga del reland en la presencia del analito. Los marcadores convenientes incluyen enzimas, inhibidores de enzima, fluoroporos, cofactores, cromoporos, oro coloidal, tintes y agentes quimiluminiscentes, y marcadores radiactivos, todos ellos son bien-conocidos en la técnica. Los medios específicos para detectar la disociación de un complejo receptor:reland dependen en parte de si el ensayo es homogéneo o
35 heterogéneo.

Una vez el receptor conveniente, reland y medios detectores son escogidos, el sistema de ensayo sería optimizado por el uso con una matriz de la muestra particular. Una muestra de orina tendrá las características intrínsecas diferentes que una muestra en un buffer acuoso. Lo mismo es cierto para la muestra de saliva, sangre, plasma o suero, o cualquier
40 fluido del cuerpo. El ensayo puede optimizarse variando la concentración del reactivo, la composición del buffer, el tiempo de descarga, el tiempo de detección, los controles básicos, y otras variables. Estas variables se sabe son bien conocidas en la técnica, y sus ajustes para la especificidad y sensibilidad óptima del ensayo con la matriz del ensayo particular se comprenderá rápidamente por los expertos en la técnica.

45 *Ensayos de descarga homogéneos*

El ensayo de descarga puede realizarse en una fase líquida homogénea. Tal ensayo se prefiere porque puede realizarse en un solo envase de reacción, y así está bien-preparado para el uso en los analizadores automatizados o en una membrana, y por consiguiente, es conveniente para la prueba en el lugar.

50 Un complejo receptor:reland en un ensayo de descarga homogéneo comprende un sistema de marcado conveniente como medio de detección en que la actividad del marcador es preferentemente no apreciablemente perceptible previo a la descarga del reland. Esta falta de detectabilidad generalmente es una consecuencia de las propiedades de la etiqueta y del complejo los cuales se manifiestan por sí mismos en la forma de modulación de actividad como la atenuación, inhibición, o activación del sistema de detección. La intensidad de la señal del marcador aumenta o disminuye en
55 dependencia de la formación o disociación del complejo. Los marcadores pueden incluir por ejemplo, un fluorescente, un quimiluminiscente o un marcador de la enzima atado al reland y un apagador apropiado atado al receptor. El receptor puede por sí mismo ser un apagador. La señal se apagará y no será observada señal alguna. Sin embargo, en la disociación del complejo receptor:reland y la descarga del receptor y el reland en presencia del analito, se invertirán los efectos de la modulación y el marcador será apreciablemente perceptible. Otros atenuadores de la señal dependientes de la proximidad, como la polarización por fluorescencia, son conocidos en la técnica, y pueden adaptarse para su uso en un ensayo de descarga. Alternativamente, el reland puede ser designado con un marcador del cofactor, un tinte = marcador, un inhibidor de la enzima, u otro tipo de marcador que se detecta después de la descarga como el componente FAD de glucosa oxidada descrito aquí previamente. Además se apreciará que el marcador puede estar en
60 el receptor y el apagador en el reland.
65

ES 2 265 646 T3

Ensayos de descarga heterogéneos

En otra realización, un ensayo de descarga en una fase sólida/líquida heterogénea se proporciona. En tal ensayo, el receptor se absorbe irreversiblemente en un soporte de fase sólida. Como fue usado aquí, el término “irreversiblemente absorbido” incluye asociación covalente, no-covalente, e iónica. Los soportes fase sólida incluyen plástico, perlas de polímero, perlas de vidrio, vidrio, gel de sílice, y pozos de la placa plástica de micro-valoración y membranas tales como membranas de nylon y nitrocelulosa. Sin embargo, el ensayo de descarga no se limita a la selección particular del soporte fase sólida y cualquier soporte de fase sólida conocido en la técnica puede usarse.

El reland se marca, y se forma un complejo estable que comprende el elemento marcado y el receptor sobre el elemento en fase sólida. Una vez formado un complejo receptor:reland estable, puede exponerse a la muestra. Si el analito de interés está presente en la muestra, la reacción de descarga ocurre y la señal del marcador se detecta en la fase líquida. La magnitud de la descarga, y por tanto la intensidad de la señal en la fase líquida, positivamente correlaciona con la cantidad de analito en la muestra. La concentración real puede obtenerse de las curvas estándar obtenidas o puede prepararse de acuerdo con las técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. La intensidad de la señal de la fase sólida disminuye inversamente con la cantidad de analito en la muestra.

Pueden usarse muchos marcadores en el ensayo de descarga heterogéneo. Los marcadores tales como cofactores (por ejemplo, FAD), inhibidores, cromo-poros, fluoro-poros, agentes quimiluminiscentes, radioisótopos, agentes quelantes, tintes, oro coloidal, marcadores secundarios, (por ejemplo, biotín o un hapteno), y similares puede detectarse en la fase líquida después de la reacción de descarga ya que aumentó la actividad de la enzima, la densidad óptica, la fluorescencia, la luminiscencia, la radioactividad, el color (para los tintes), la detección del marcador secundario (por ejemplo, usando avidina o estreptavidina para detectar biotín, o un anticuerpo específico del hapteno para detectar el hapteno), y la turbidez (para oro coloidal), respectivamente. Donde la señal desde el marcador que permanece limitada en el complejo receptor:reland no puede detectarse, el ensayo puede realizarse sin una etapa de separación, por ejemplo, en un solo recipiente.

En una realización particular preferida para los montajes fuera del laboratorio, la presencia de un analito se indica por la aparición de una forma, es decir, una letra, en un campo de reacción sobre un soporte fase sólida. De acuerdo con esto, un campo de reacción comprendiendo una zona del indicador y una zona de control se prepara sobre un soporte fase sólida. La zona del indicador comprende el receptor inmovilizado como se proporciona por el formato del ensayo heterogéneo. Un complejo receptor:reland en la zona del indicador es sensible a la reacción de descarga. La zona de control que comprende un complejo receptor:ligante diferente o reland en la zona de control no es susceptible a la reacción de descarga específica, pero puede indicar descarga no-específica si las condiciones son como para causar descarga no-específica.

En la práctica, contactando la muestra que contiene el analito de interés en el campo de reacción resultará en una reacción de descarga perceptible en la zona del indicador, y ninguna reacción en la zona de control. La reacción de descarga se detecta como la formación de una zona contrastante que corresponde a la zona del indicador. Para lograr esto, el marcador para ambos la descarga del complejo y el control del complejo se escoge para contrastar con el soporte sólido.

Si no hay desarrollo de una zona de contraste, la muestra es negativa. “Decoloración” de ambas la zona del indicador y la zona de control, es decir, descarga del marcador de ambos complejos, indica una reacción positiva falsa, condiciones de reacción impropias, o posible adulteración de la muestra. De esta manera, la zona de control mantiene un control para resultados exactos del ensayo. En una realización alternativa, la zona de reacción en que un complejo receptor:reland azul se inmoviliza, es amarilla. La descarga del reland (color azul) que originalmente oscurece el color amarillo, causa un cambio de color del azul (negativo) a verde (ligeramente positivo) a amarillo (fuertemente positivo).

Preferentemente se usan letras diferentes o símbolos como indicador dependiendo del analito de interés. Por ejemplo, la zona del indicador específica para el uso de la cocaína puede denominarse por la letra “C”: una zona del indicador para el uso de la marihuana denominado por la letra “M” (por “T” para el tetrahidrocannabinol), y una zona para indicar uso de nicotina denominado por la letra “N”.

Está claro que otras combinaciones del receptor:reland trabajarán igualmente bien como complejos de control. Se considera además que un soporte simple fase sólida puede contener más de un campo de detección, ya que cada campo de detección es específico para un analito particular e insensible para cualquier otro análisis, por ejemplo, tetrahidrocannabinol, benzoilecgonina, y cotinina, en un formato simple.

Los marcadores convenientes para su uso en este ensayo incluyen pero no se limitan a los tintes coloreados, oro coloidal, y similares. También, cualquier soporte fase sólida puede usarse en esta realización, pero plástico y membranas, tales como nitrocelulosa o nylon, se prefieren. Además, el soporte sólido, una membrana por ejemplo, puede llevar unas series de líneas del complejo reland:receptor marcado dispuestas en el formato de código de barra, cada línea/barra específica para un analito diferente. Cuando tal miembro se sumerge por ejemplo en un aglutinante de prueba, como leche, saliva, orina, sangre, muestra medioambiental o similares, la presencia de un analito específico para una barra causará pérdida del reland marcado desde esa barra, causando un cambio que puede leerse por el lector del código de barras..

En otra realización, FAD se conjuga al reland. La tira es una membrana que comprende un complejo FAD-reland:receptor, óxido de apoglucosa, glucosa, peróxido del rábano picante (HRP), y un cromógeno de tetrametil benzidina (TMB). Considerados juntos, la FAD, apoGO, glucosa, y HRP constituyen los medios para detectar la descarga. Contactando la muestra que contiene el analito con la membrana resulta en la descarga del reland/FAD que es entonces liberado para activar con apoGO que oxida la glucosa produciendo H_2O_2 , producto que es entonces reducido por el TMB para resultar en la forma oxidada del TMB coloreada de azul. Este sistema puede fabricarse de la misma manera empleada para obtener las tiras para medir la glucosa de la sangre.

En otra realización incluso, el complejo receptor:reland/FAD se inmoviliza a la base o “bulbo” de una membrana en forma de termómetro. La tira sobre la base contiene apoGO inmovilizado y peroxidasa. La descarga de FAD/reland por el analito causa que el FAD/reland migre a lo largo de la longitud de los ApoGO-impregnados y se ligue al apoGO. El apoGO se convierte ahora en la enzima activa, la cual inicia entonces la reacción productora de color referida en el párrafo anterior. Esa porción de la longitud de la tira o la altura de la columna que se activa en proporción a la cantidad de FAD/reland liberada cambia el color y puede leerse visualmente como se leería un termómetro. Por ejemplo, una escala de números correspondiendo a las concentraciones puede proporcionarse a lo largo de la longitud de la tira. Alternativamente, en lugar de una escala numerada, el área de lectura puede ser dividida en zonas de color que indican lecturas semi-cuantitativas. Por ejemplo, podrían asignarse colores específicos a las concentraciones bajas, medias, altas, muy altas. En otra realización preferida, la tira anteriormente en forma de termómetro está en un dispositivo laminado como el descrito en el U.S Patent Application Serial de Serex No. 08/047,156 archivado el 13 de abril de 1993, Patente Pendiente por Lee Own y Fitzpatrick.

La invención se ilustrará más adelante por los Ejemplos siguientes, que se piensa son realizaciones completamente específicas de la invención.

Ejemplo 1 comparativo

Ensayo de descarga para cotinina

Cotinina y trans-3'-hidroxicotinina son los metabolitos mayores de nicotina (Langone y otros, 1973, Biochem. 12:5025-30; Jacob y otros, 1991, J. Chromatography 222:61-70; Neurath y otros, 1987, Int. Arch. Occup. Environ. Health 59:199-201). Ellos aparecen en la orina en una proporción 1:3 (Neurath *et al.*, *supra*). La detección de cotinina en la orina, suero o saliva es el método bioquímico normalmente usado para determinar niveles de exposición a la nicotina (Fitzpatrick, 1991, Clinical Chemistry News, vol. 11). Diferente a otras drogas de abuso, la cotinina se encuentra en los fluidos del cuerpo de no usuarios debido al fumador pasivo. El rango de interés para un ensayo de cotinina es desde 0.010 ug/ml necesario para análisis de saliva y de sangre, hasta 10 ug/ml para la orina de usuarios del tabaco (Greenberg y otros, 1984, N. Engl. J. Med. 310:1075-78; Matsukura y otros, 1984, N. Engl. J. Med. 311:828-31; Sepkovic y otros, 1986, J.A.M.A. 256:863; Jarvis y otros, 1987, Am. J. Public. Health 77:1435-8; Schepers y Walk, 1988, Arch. Toxicol. 62:395-7; Langone y otros, 1988, J.I.M. 114:73-8).

En este Ejemplo, se describen los ensayos de descarga de cotinina que usan N-propilcarboxilnicotina y N-isopropilcarboxilnicotina como relands de afinidad muy baja. Cis 3'-hidroxicotinina también fue evaluado. Los ensayos de descarga fueron realizados en un formato homogéneo similar al ensayo de EMIT[®] y el formato heterogéneo (placa de micro-valoración, formato ELISA) y comparado a un ensayo competitivo convencional para la cotinina. Los resultados demostraron que los ensayos de descarga de la invención son más precisos y exhiben menos interferencia de la reactividad cruzada que los ensayos conocidos. Es más, el ensayo de descarga de la invención tiene una curva estándar que es lineal, $r = 0.999$ (vea Fig. 4), y un rango dinámico que es casi 3 veces logs mayor que los ensayos actualmente conocidos, competitivo, o disociación o tipo bocadillo.

Los materiales siguientes y secciones de métodos partieron de descripciones generales de los reactivos preparadas y usadas en los ensayos; así como los métodos empleados.

Materiales y métodos

La instrumentación incluyó un Instrumento de Laboratorio SLT 340ATTC Micro-valoración Lector de Placa, y un Auto analizador COBAS MIRE. Las muestras de orina eran previamente analizadas para la cotinina de una población general. Se guardaron las muestras a -20 grados.

Todos los químicos eran de Sigma Aldrich a menos que otra cosa se estableciera. Se compraron Cis y trans-hidroxicotinina del laboratorio de George Neurath (Vea Neurath y otros, *supra*). Dehidrogenasa de Glucosa-6-fosfato (G6PD) era de Beckman. El conjunto de ensayo para el Metabolito de Nicotina, NiMA AutoMates[®], y los Conjuntos ELISA, el Tabaco Screen[®], y los ensayos Cuantitativos de Trazas de Cotinina CotiTraq[®], sistema de cromógeno TMB, anti-Cotinina antisera, peroxidada marcada anti-Cotinina y los patrones de orina Cotinina son comercialmente disponibles de Serex, Inc. (Maywood, NJ).

El receptor

El anti-suero para el carboxilcotinina se obtuvo como sigue: 320 mg de hemocianina de lapa del ojo de la cerradura (KLH) fueron disueltos en 40 ml de agua de-ionizada. A esto se adicionaron 300 mg de trans-4-carboxilcotinina con mezclado hasta disolución. 300 mg de 1-etilo-3-dimetilaminopropil carbodiimida (EDC) se adicionaron a la mezcla de la reacción con agitación y agitado toda la noche a temperatura ambiente. El conjugado KLH-carboxilcotinina (inmunógeno) fue dializado durante 8 horas a las 2-8 grados contra fosfato con un buffer salino. El fluido de la diálisis se cambió una vez después de 4 horas.

Se inmunizaron los conejos con el inmunógeno en el adyutor de Freund, con inyecciones múltiples durante varios meses, según los protocolos estandarizados. La prueba de sangrado se hizo a intervalos definidos, y aumentos en la concentración del anticuerpo medido usando un inmunoensayo de la enzima para la cotinina. También se realizaron mediciones de la afinidad del anticuerpo y de la reactividad cruzada. Cuando estos ensayos indicaron una actuación satisfactoria del anticuerpo, sangraron los conejos y se aislaron y agruparon los sera. El antisuero se guardó a -40 grados C.

El fragmento de IgG fue separado del suero por precipitación de sulfato de amonio. Una columna cromatográfica de inmunoafinidad se preparó acoplando la hidroxilcotinina succinilada a través de su grupo carboxilo a la amino-sefarosa 4B. La afinidad del anticuerpo purificado se marcó con peróxido del rábano picante usando el método del metaperiodato de sodio.

Preparación de relands

1-Isopropil-4-carboxil-5-(3-piridil)-2-pirrolidinona, (de ahora en adelante, N-isopropilnarcotinina) y 1-propil-4-carboxil-5-(3-piridil)-2-pirrolidinona (de ahora en adelante, N-propilnarcotinina) (Fig. 1C y 1D) se prepararon según el método de Cushman y Castagnoli (1972, J. Org. Chem 37:1268). Brevemente, a una solución de 17 g de piridina-3-carboxilo-aldehído en 50 ml de benceno se adicionó una solución de benceno de 8 g iso propilo amina (u 8 g propilo amina) y 12 g de perlas de tamizado molecular. La mezcla se agitó a 20 grados C durante toda la noche en un frasco. La solución se filtró a través de dos capas de papel de filtro Whatman No. 2 y se evaporó bajo presión reducida para dar la imina como un aceite amarillo. La estructura de los productos fue confirmada por NMR.

N-isopropilnorotina y N-propilnarcotinina se prepararon como sigue. Doce g de N-3-piridilideno isopropilimina o N-3 piridilideno propilimina y 15 g de anhídrido succínico fueron refluados durante 24 horas en 100 ml de xileno. Después que la mezcla se refrescó, la capa superior fue decantada y desechada. El residuo de aceite castaño se disolvió en 300 ml de solución de bicarbonato de sodio al 5%, lavada con dos porciones de 250 ml de cloroformo, y decolorada por absorción con 1 g de carbón activado. La suspensión se filtró y el filtrado amarillo fue calentado en un baño corriente para remover trazas de cloroformo. El pH se ajustó a 4.7 con ácido fosfórico para precipitar el producto. El ácido carboxílico crudo fue recolectado por filtración y re-cristalizado desde etanol hirviente para dar 4 g de cristal blanco. La estructura de cada compuesto fue confirmada por NMR.

Preparación de conjugados de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PD)

Los conjugados de N-isopropilnarcotinina, N-opropilnarcotinina y cis 3'-hidroxilcotinina al glucosa-6-fosfato dehidrogenasa se prepararon usando los métodos descritos por Rubenstein y Ullman (1975, Patente americana No. 3,875,011). Brevemente, a 1 ml de 0.1 M buffer de carbonato sódico, pH 9.0, se agregó 0.43 ml de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (2.8 mg), 20 mg de NADH (sal di-sódica), 10 mg de glucosa-6-fosfato, y 300 ul de carbitol. La solución ("solución de enzima") se guardó a 4 grados C para enfriar.

A un tubo de ensayo vacío se agregaron 26 mg de N-propil o N-isopropilnarcotinina, 12 mg de N-hidroxisuccinimida, 21 mg de dicitclohexil-carbodiimida, y 1.0 ml de dimetilformamida. Esta mezcla se dejó a temperatura ambiente por 1 hora para permitir que se formara el éster de cotinina activado. Después de 1 hora, se agregaron 10 ul de la mezcla de la reacción a la solución fría de la enzima a intervalos de 15 minutos hasta un total de 70 ul (90 minutos en total). Quince minutos después de la adición de la mezcla de la reacción, la enzima modificada fue dializada contra cinco cambios de cada 1 litro del buffer 0.055 M Tris-HCl, pH 7.9, durante por lo menos tres horas cada uno.

El G6PD se usa como un marcador cuando está conjugado al reland y usado en un sistema homogéneo. Cuando el reland conjugado se usa en un sistema heterogéneo, el G6PD no se usa como un marcador, sino como una proteína portadora para reforzar la unión del hapteno a la fase sólida. Cuando está conjugado al G6PD, el reland está en forma de multimérica y la constante de asociación sobre unos 5 logs mayor que para la forma monomérica. El reland en esta forma no se prefiere si la estabilidad de los complejos a largo plazo, hasta 6 meses se requiere como se requeriría si los complejos fueran suministrados en un conjunto. Para tales propósitos, se usa generalmente el reland bajo 5,000 Daltons.

Reactivos para el ensayo de descarga homogéneo

Se prepararon soluciones del reactivo para el ensayo de descarga homogéneo de cotinina como tres soluciones separadas, reactivos A, A+, y B. El reactivo A consistió en reland de dehidrogenasa de glucosa-6-fosfato conjugado a una concentración de proteína de 0.74 ug/ml, 0.05 M de buffer Tris, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 1.75 mg/ml

ES 2 265 646 T3

de glucosa-6-fosfato, 0.5% de BSA, y preservativos a pH 7.9. El reactivo A+ consistió en antisera en un buffer del reactivo A.

El reactivo A y A+ se mezclaron previo a su uso para formar la solución de trabajo A que es estable durante una semana a 4 grados C.

El reactivo B consistió en NAD a 3.3 mg/ml en 0.02 M buffer Tris, pH 7.0.

La reactividad cruzada se probó con cotinina y/o soluciones del trans-3-hidroxicotinina preparadas como sigue. A 10 ml de un charco de orina negativa se agregaron 100 ug de cotinina o trans-3'- en la misma orina negativa estándar para hacer soluciones de 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31 y 0.16 ug/ml de cotinina o trans-3'-hidroxicotinina.

Para preparar la solución 1:3, cotinina:trans-3'-hidroxicotinina, una alícuota de 10 ml de orina negativa estándar fue asegurada con 100 ug de cotinina y 300 ug de trans-3'-hidroxicotinina. Esta solución fue agitada fuertemente y consecutivamente diluida en la misma orina negativa estándar para formar diluciones de 5 (15), 2.5 (7.5), 1.25 (3.75), 0.62 (1.87), 0.31 (0.94), 0.16, (0.48) ug/ml de cotinina (hidroxicotinina)

La reactividad cruzada fue calculada usando la formula siguiente:

$$\frac{\text{concentración encontrada (ug/ml)}}{\text{concentración del reactante cruzado (ug/ml) en la muestra}} \times 100\%$$

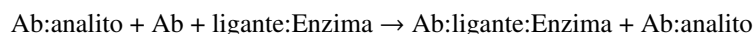
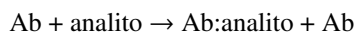
Ensayo de descarga en el formato elisa (heterogéneo)

Salando las placas de micro-valoración se recubrieron durante la noche con 100 ul de cualquier dehidrogenasa de glucosa-6-fosfato conjugado a N-propilnarcotinina o N-isopropilnarcotinina a 1 ug de proteína por ml de PBS; los pozos fueron vaciados, secados y almacenados con desecante hasta su uso. Para activar para la descarga, la placa se incubó 1 hora con 100 ul de peróxido de rábano picante-marcado, la afinidad del anticuerpo de anticotinina purificado,. El exceso de anticuerpo fue removido por 2 lavados con PBS en 0.05% Tween 20.

A una placa de micro-valoración recubierta con un complejo del complejo anticuerpo:reland preparado anteriormente, 10 ul de patrones de orina (0, 0.5, 2, y 8 ug de cotinina/ml) y 90 ul de agua destilada se agregaron a cada pozo. Después de 2 minutos, 50 ul que sobrenadan fueron transferidos a los pozos no recubiertos conteniendo 100 ul de TMB e incubados por 10 minutos. La reacción fue detenida con 50 ul de H₂SO₄ 2N y se leyó a A450 nm.

Se muestran los resultados del ensayo en Fig. 2. La descarga del anticuerpo marcado acomplejado a la fase sólida fue detectada en la sobrenata cuando la cotinina libre estaba presente en la muestra. A diferencia de los inmunoensayos competitivos convencionales, la absorbancia, o señal fue directamente proporcional a la concentración del analito. Las características de mejor descarga se demostraron por el cis-hidroxi-cotinina (curva 1), seguido por el isopropil cotinina (curva 2) con el compuesto N-propilo (curva 3) mostrando la menor descarga. A pesar de la descarga superior desde los conjugados de hidroxicotinina, el compuesto de hidroxicotinina no se considera que sea un reland conveniente en este sistema debido a su tendencia a formar un complejo que con el tiempo se vuelve no posible a descargar. En el ensayo de descarga formato ELISA el punto final reduce el tiempo para el ensayo por debajo de 15 minutos (2 minutos durante la reacción de descarga y 10 minutos para el desarrollo del color por TMB) de las 1-2 horas normalmente requeridas en el formato Elisa convencional de la cotinina. El tiempo del presente ensayo podría además ser acortado, por ejemplo, automatizando etapas del ensayo como ejecutando un ensayo de velocidad de reacción en un instrumento automatizado. El ensayo de descarga también reduce el número de etapas del ensayo por lo menos a la mitad. Una ventaja adicional es que la descarga da una señal positiva en la presencia del analito.

El *Ensayo Homogéneo Convencional*. El formato de NiMA AutoMates^R (marca comercial de Serex, Inc., Maywood, New Jersey) es un ensayo homogéneo, competitivo o tipo EMIT, como es descrito por Tubenstein, Schneider, y Ullman (1972, arriba). Hay dos etapas para la reacción inmune:



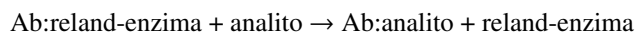
Brevemente, la muestra se pre-incubó con antisera durante varios minutos. En la mezcla de la reacción se agregó dehidrogenasa de glucosa-6-fosfato (enzima) conjugado al ligante de cotinina. El anticuerpo que no ha interactuado con la cotinina en la muestra liga a la cotinina en la dehidrogenasa de glucosa-6-fosfato. El enlace del anticuerpo al ligante unido a la enzima inhibe la actividad de la enzima, así la actividad de la enzima está directamente relacionada a la concentración del analito en la muestra. La actividad de la enzima de dehidrogenasa de glucosa-6-fosfato fue medida supervisando la formación de NADH a A340 nm, la cual se forma cuando la enzima oxida a la glucosa-6-fosfato a glucono-lactona-6-fosfato y reduce NAD a NADH.

ES 2 265 646 T3

Los ensayos homogéneos convencionales se realizaron en COBAS MIRA según los parámetros de la hoja de aplicación NiMA Auto Mates® como sigue:

Doscientos ul de reactivo se incubaron con 10 ul de muestra a 37 grados durante 75 segundos. Cincuenta ul del reactivo B se agregaron y la mezcla se incubó durante 25 segundos. La absorbancia se leyó durante los 250 segundos finales. El tiempo total del ensayo fue 5.83 minutos.

El Ensayo de Descarga en Formato Homogéneo. El ensayo homogéneo de la presente invención, se realizó en Cobas Mira en el formato AutoMates® (marca comercial de Serex, Inc. Maywood, New Jersey), utilizando el mismo sistema de enzima, y los mismos reactivos (excepto para el reland) como el ensayo homogéneo convencional, pero modificado como sigue para volverse una reacción de descarga.



Para hacer el producto Ab:reland-enzima, el reland:enzima conjugado en el buffer y antisera (Ab) en el buffer se mezclaron por un mínimo de una hora para formar un reactivo de trabajo A que es estable durante 1 semana a 4 grados C. La reacción se inició por adición de muestra (25 ul) y NAD (10 ul-Reactivo B) a doscientos ul de reactivo de trabajo A (incubado durante 25 segundos). La absorbancia se leyó durante los 200 segundos finales. El tiempo total del ensayo fue 5.0 minutos. Como en el ensayo competitivo convencional, la actividad de la enzima se midió supervisando la formación de NADH a $A_{340\text{nm}}$. La actividad de la enzima es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.

Las curvas respuesta de dosis para el convencional (NiMA®) (curva 2) y el ensayo de descarga homogéneo (curva 1) demuestra el rango grandemente aumentado del ensayo de descarga (Fig. 3). Como puede verse de la Fig. 3, la cantidad máxima de cotinina que puede medirse usando el ensayo competitivo convencional tipo EMIT en 2 ug/ml. Además, la menor sensibilidad final del ensayo de descarga es 10 ng/ml lo opuesto a 50 ng/ml para el ensayo convencional (vea Tabla 1). El rango del ensayo de descarga se amplía porque el ensayo de descarga no es competitivo y porque es un sistema que se inicia en equilibrio. Es por consiguiente posible usar concentraciones iniciales superiores del complejo de la enzima sin incrementar el ruido de perder sensibilidad al final. En los inmunoensayos competitivos convencionales, la adición de más reactivos cambia la sensibilidad del ensayo por elevar las condiciones finales de equilibrio. Las concentraciones de la enzima usada para demostrar el ensayo de descarga fue 0.50 ug/ml comparado a 0.03 ug/ml para el ensayo convencional homogéneo (asociativo). Sin embargo, el ensayo del tipo convencional tenía aproximadamente 8 veces más anticuerpo por la molécula de la enzima que el ensayo de descarga. La relación de anticuerpo a enzima determina la sensibilidad del ensayo.

La comparación de los formatos competitivo y de descarga se presenta en la Tabla 1 debajo, para mostrar otras variables.

TABLA 1

Comparación de un ensayo de descarga homogéneo para cotinina y uno homogéneo convencional EMIT para cotinina (NiMA)

	Descarga	NiMA-EMIT
Dilución Final Antisera	$4,8 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3}$
Concentración Final del Conjugado	0.51 ug/ml	0.03 ug/mL
Dilución Antisera/ug de Conjugado	$9,6 \times 10^{-3}$	80×10^{-3}
Límite Inferior de detección	0.01 ug/ml	0.05 ug/mL
Límite Superior de detección	1000 ug/ml	2 ug/mL
Tiempo	5 min	5.8 min

La Tabla 1 muestra que el ensayo de descarga utiliza 17-veces más enzima y dos-veces más anticuerpo que el ensayo competitivo. Pero la enzima y el anticuerpo aumentados no resultan en sensibilidad disminuida como ellos hacen en el inmunoensayo competitivo: (podrían utilizarse cantidades más pequeñas de todos los reactantes en el ensayo de descarga, pero esto limita el rango superior del ensayo). La Figura 4 muestra el rango extraordinario del ensayo de 0.01-1000 ug/ml. En el ejemplo mostrado, un aumento de 17-veces en el reactante conduce a un aumento mayor de 1,000-veces en el rango del ensayo, sin pérdida de sensibilidad o precisión, en el extremo bajo de la curva. Esta formulación es sensible a 10 ng/ml y puede usarse para cuantificar muestras de saliva. La relación anticuerpo a enzima del ensayo convencional usa 8-veces más anticuerpo por molécula de la enzima que la descarga. En el ensayo de descarga todas las moléculas del anticuerpo pueden estar limitadas al reland conjugado a las enzimas y pueden ser capaces de ser liberadas por el analito. En el ensayo convencional hay un exceso grande de anticuerpo, que disminuye el tiempo de reacción pero también disminuye la sensibilidad. La habilidad del ensayo de descarga para monitorear la actividad de un porcentaje muy grande del anticuerpo en la mezcla de la reacción aumenta sensibilidad y disminuye ruido de fondo y tiempo de reacción. La descarga aquí es desde el múltímero y hasta un 100% indicando la incapacidad del múltímero para competir substancialmente.

ES 2 265 646 T3

Reactividad-cruzada:trans-hidroxicotinina

La mayor especificidad del ensayo de descarga en relación al ensayo convencional fue confirmada demostrando (Tabla 2) que el trans-3'-hidroxicotinina, un metabolito de la nicotina, interfiere (reacciona en cruz) mucho menos en el ensayo de descarga que en un ensayo competitivo convencional. Esto es importante porque el trans-3'-hidroxicotinina y otros metabolitos interfieren en el sistema de detección para cotinina en inmunoensayos.

TABLA 2

Interferencia de trans-hidroxicotinina en la descarga y ensayos homogéneos competitivos (NiMA) para el ensayo de descarga homogéneo tipo EMIT para la cotinina

Gránulos de cotinina en la orina			Trans-Hibroxicotinina	
Conc. de Gránulos (ug/mL)	Concentración Encontrada (ug/mL)	% de Recuperación	Concentración Encontrada (ug/mL)	% de Recuperación
10	9.03	90	1.69	16.9
5	4.22..	84	0.72	14.4
2.5	2.15	86	0.29	11.6
1.25	1.15	92	0	0
0.62	0.63	102	0	0
0.31	0.25	81	0	0
0.16	0.14	88	0	0
AVG		89		6.1

Convencional EMIT®

Gránulos de Cotinina			Gránulos de Trans-hidro-IC3tinima	
Granulo	Conc. Encontrada (ug/mL)	% de Recuperación	Concentración Encontrada (ug/mL)	% de Recuperación
10	11.85	119	1.87	18.7
5	5.6	112	0.85	17
2.5	2.03	81	0.44	17.6
1.25	1.59	127	0.21	16.8
0.62	0.59	95	0.17	27.4
0.31	0.49	158	0.11	35.5
0.16	0.13	81	0.08	37.5
AVG		110		24.4

Mientras el ensayo de descarga mostró la reactividad cruzada a un cuarto del ensayo convencional con la hidroxicotinina, no hubo ninguna reactividad cruzada en el extremo inferior de la curva, es decir donde la concentración en las prácticas clínicas es crítica. Significativamente, la cantidad mayor de interferencia en el ensayo convencional se observó al extremo inferior de la curva, es decir la misma porción del ensayo en la cual no se desea reactividad cruzada.

ES 2 265 646 T3

Reactividad cruzada de N-isopropil norcotinina

A la prueba extensa la estabilidad y liberabilidad del complejo anticuerpo-reland nosotros le caracterizamos la habilidad del N-isopropilnarcotinina para interferir en los ensayos de varios serex de cotinina todos usados en el mismo anticuerpo. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Reactividad cruzada para N-isopropil-4-carboxilonarcotinina en los ensayos convencional y de descarga

% De reactividad cruzada

Reland-orina Convencional Granulada (ug/mL)	Convencional Heterogéneo CotiTraQ®Elisa	Descarga Homogéneo Emit	Homogéneo Emit NiMA
0.24	0%	0%	< 0
0.5	0%	0%	< 0
2	0%	0%	< 0
4	0.3%	0%	0.05%
10	0.3%	0.4%	0.11%
100			0.24%

El reland, N-isopropilcotinina, mostró menos de 0.4% de reactividad cruzada con el anticuerpo detector (el mismo para todos los ensayos) incluso en concentraciones tan altas como 100 ug/ml, un punto bien fuera del rango fisiológico. El reland no muestra reactividad cruzada con el anticuerpo acomplexado a él en G-6-P-DH hasta 100 ug/ml.

Datos clínicos

El ensayo de descarga identificó correctamente las 106 muestras clínicas como los fumadores (mayor que 0.5 ug/ml de cotinina). El ensayo de descarga homogéneo, NiMA AutoMates® y Tobacco Screen® (una prueba Elisa comercializada por Serex para ensayo en muestras de orina para cotinina) se compararon usando un corte de 0.5 ug/ml de cotinina. La Tabla 5 muestra que la descarga del ensayo homogéneo de la invención correlaciona al 100% con ambos métodos de prueba (Tobacco Screen® correlaciona al 100% con los resultados HPLC).

TABLA 4

Comparación de los ensayos de descarga homogéneos de la cotinina con los ensayos convencionales, tobacco Screen® (Elisa) y NiMA (homogéneo)

	TOBACCO SCREEN®			NIMA®	
	+	-		+	-
+	106	0	+	106	0
DESCARGA			DESCARGA		
-	0	34	-	0	34
	n = 140			n = 140	

Precisión del ensayo

Los ensayos de descarga homogéneo y NiMA® para cotinina se evaluaron para precisión en COBAS MIRA usando un negativo, muestras de orina 0.5 ug/ml y 2 ug/ml (Tabla 6). La precisión se usa para indicar el coeficiente de variación de ensayos repetitivos sobre la misma muestra. El ensayo de descarga mostró una mejora más del doble en la precisión sobre el ensayo competitivo. Aún cuando las concentraciones del reactante son 17 veces mayores que en NiMA®, el ensayo de descarga tiene mejor precisión.

ES 2 265 646 T3

TABLA 5

Precisión de los ensayos de descarga homogéneos y el convencional NiMA para cotinina. Los resultados expuestos son la velocidad de reacción en mA/MIN

Descarga EMIT®

Control Negativo 0.0 ug/mL	Control por Corte 0.5 ug/mL	Control Positivo 2.0 ug/ml
n = 15	n = 15	n = 15
avg = 177.79	avg = 185.4	avg = 194.56
SD = 0.88	SD = 0.89	SD = 0.81
CV = 0.5%	CV = 0.5%	CV = 0.4%

Convencional EMIT® (NiMA)

Control Negativo 0.0 ug/mL	Control por Corte 0.5 ug/mL	Control Positivo 2.0 ug/ml
n = 15	n = 15	n = 15
avg = 49.52	avg = 55.86	avg = 58.27
SD = 0.69	SD = 0.75	SD = 0.78
CV = 1.3%	CV = 1.3%	CV = 1.3%

La mejora mayor que dos veces en la precisión observada con el ensayo de descarga de la invención es probablemente multifactorial: el sistema inicial está en equilibrio; solamente una reacción, disociación ocurre; y la matriz, como evidenciada por la reactividad cruzada menor, probablemente tiene menos efecto sobre la reacción.

Ejemplo 2

Ensayo de descarga para marcador de osteoporosis

El marcador para un ensayo de osteoporosis mostrado debajo es piridinolina libre, un producto de degradación de hueso y cartílago bien conocido. El marcador puede prepararse según el método de Akiba K. y Nakamura N., 1977, B.B.R.C., 76:1124.

Los candidatos para relands se escogieron de los análogos de la piridina seleccionados del catálogo de Aldrich. Dos análogos, piridoxamina y piridoxal fueron marcados con biotina como sigue:

Síntesis del Conjugado Pirodoxal-Biotina

A una mezcla de sal cloruro de hidrógeno piridoxal (5.7 mg, 0.028 mmol) y biotin hidracida (7.9 mg, 0.031 mmol) en DMF (1 mL) se adicionó trietilamina (4.7 uL, 0.033 mmol). La mezcla se agitó a 4 grados C durante la noche y el solvente fue removido bajo presión reducida. El residuo se trató con ácido trifluoroacético al 0.1% en agua y el solvente fue removido bajo presión reducida. El residuo fue entonces re-cristalizado desde metanol para dar 5.0 mg de conjugado piridoxal-biotin como un polvo blanco apagado.

Síntesis de conjugado Piridoxamina-Biotin

A una suspensión de hidrocloreto de piridoxamina (11.8 mg, .049 mmol) en 1.5 mL DMF se agregó trietilamina (Et₃N). (20.5 uL, 0.15 mmol). N-hidroxi-succinamida-biotin (18 mg, 0.054 mmol) se adicionó entonces a la anterior solución clara y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. La mezcla de la reacción se concentró y el residuo se purificó por la preparación TLC (1% Et₃N-10% MeOH en CH₂Cl₂) para dar 10.1 mg del conjugado piridoxamina-biotin como un polvo rosáceo.

Ligantes de análogos biotinilados para el anticuerpo monoclonal de antipiridinolina

Fueron limitados la piridoximina biotinilada y el piridoxal biotinilado al anticuerpo de antipiridinolina como sigue:

Antipiridinolina (anticuerpo monoclonal del CONJUNTO PYRALINKS producido por Metra, Inc. de California) fue recubierto sobre una placa de micro-valoración a una concentración de 4.6 ug/ml de PBS durante la noche a RT. La placa recubierta con el anticuerpo se incubó con concentraciones diferentes del candidato a reland biotinilado (10 ul de reland + 90 ul de PBS 0/6% Tween 20, pH 7.4) toda la noche a 4 grados C. La placa fue entonces lavada e incubada 30 minutos con el conjugado de peróxido del rábano picante-avidin (Jackson Immuno Research Lab., PA a 0.1 ug/ml en una solución de albúmina de suero bovino, 1 mg/ml de PBS, pH 7.4, 0/6% Tween 20. Después del lavado, el peróxido limitado fue medido con TMB. La cantidad de peróxido limitado fue directamente proporcional a la cantidad de análogo biotinilado limitado a la fase sólida del anticuerpo. Los resultados de piridoxal-biotin se muestran en la Fig. 12. Como puede verse, el conjugado de piridoxal-biotin resultó un aglomerante superior para el anticuerpo.

Descarga del piridoxal biotinilado desde el complejo con anticuerpo por piridinolina libre

El anticuerpo de antipiridinolina fue recubierto sobre una placa de micro-valoración como se describió anteriormente. La placa recubierta con el anticuerpo se incubó con 100 ul de solución de piridoxal biotinilado a concentración final de 200 ug/ml en PBS, pH 7.4 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavada, la placa se incubó con el conjugado de avidin-peroxidasa (de Jackson Imm. Res. Lab.) a 0.1 ug/ml en 1 mg/ml de albúmina de suero bovino en el buffer del lavado, pH 7.4, durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Después de eliminado un exceso de conjugado de avidin-peroxidasa, la descarga con piridinolina libre (METRAS^{supra}) se realizó. 100 ul de niveles diferentes de piridinolina (0, 0.09 ug/ml, 0.9 ug/ml) en PBS se agregaron a la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente. Entonces 75 ul de la fase líquida se transfirió a otra placa de micro-valoración y se adicionó a 75 ul de solución Serex TMB diluida 1/10 en agua de-ionizada. La cantidad de peróxido liberado reflejó la cantidad de reland biotinilado liberado desde el complejo con el anticuerpo. Los resultados se muestran en la Fig. 13.

*Ejemplo 3**Ensayo de descarga para la hemoglobina glicada*

Este Ejemplo demuestra la viabilidad de un ensayo de descarga para una proteína, hemoglobina glicada (Hb Glc). Tal formato traerá facilidad aumentada de actuación y aumentará precisión comparada a los ensayos competitivos convencionales o tipo bocadillo. En particular, el ensayo Hb Glc de la invención parece tener significativa superioridad sobre los ensayos convencionales en su habilidad de diferenciar entre las formas glicada y no-glicada de la hemoglobina (Hb).

Hb Glc constituye hasta un 4% de la hemoglobina en una muestra normal. Este nivel puede ser 2-3 veces mayor en los diabéticos. Así, Hb Glc es una indicación del pronóstico útil de control de la glicemia sobre el mes anterior. Hay tres sitios *en vivo* de glicación de la hemoglobina a cualquiera uno o más de los grupos amino epsilon libres, además de las características de modificación de la glicación de la hemoglobina A1C (Hb Alc). La Hemoglobina Alc es hemoglobina que está glicada en el terminal amino valine de la cadena beta de la hemoglobina. Los otros tres sitios de glicación en la molécula, puede o no ser glicada en Hb Alc. En las muestras normales, 2-4% de la hemoglobina puede ser Hb Alc, y este nivel también puede ser dos a tres veces mayor en los diabéticos.

Dos anticuerpos monoclonales específicos para la glico-hemoglobina humana se obtuvieron de Exocell (Filadelfia, PA), Clon A 1.58 mg/ml E85.1A lote 94H 4.142, Clon B 2 mg/ml E85-1B lote 94C 3.01). HbAo (Hb noglicada) y se obtuvo HbGlc de Exocell. Los anticuerpos fueron cada uno valorados contra el Hb glicado y no-glicado ambos de Exocell como sigue:

Ensayo convencional usado para la evaluación. La placa de micro-valoración fue recubierta con Hb Ao o HvGlc en PBS a una concentración de 10 ug/ml. El Clon A y el Clon B se diluyeron 1:20 en PBS y 100 ul fueron adicionados bien a cada uno e incubado por 1 hora. La placa se lavó con PBS e interactuó con fosfatasa alcalino marcado antiraton (Sigma A3688) durante una hora. Después de lavado, el fosfatasa alcalino se detectó con p-nitro-fenilo fosfato (PNPP) (Kirkegaard & Perry Labs, Maryland) durante 60 minutos, Fig. 5. ambos clones interactuados con ambos Hb glicado, el modelo más oscuro y el Hb no-glicado. El Clon B pareció ser más reactivo.

La reactividad hacia el Hb no-glicado estaba entre 50% y 70% de la observada con el Hb glicado. Así, este anticuerpo, en un formato del ensayo convencional donde hay 90-98% Hb noglicado + 2-10% Hb glicado, no es favorablemente específico para la hemoglobina glicada.

La reactividad cruzada entre la hemoglobina glicada y no-glicada vistas con el anticuerpo monoclonal Exocell era esperada. Hay sólo una diferencia pequeña entre la Hb Glc no-glicada que es la lisina glicada, con el resto del epitope el mismo en cada molécula.

ES 2 265 646 T3

La sucesión de hemoglobina a que ambos anticuerpos se dirigen se ha identificado como el sitio beta 17 (lisina), pero parecería que hay reactividad cruzada con el sitio beta 66, el cual es muy similar (ambos sitios comparten una sucesión gli-lis-val). Además, el anticuerpo se reporta para reaccionar con ambos Hb glicado *en vivo* y *en vitro*. Las sucesiones de los sitios de glicación putativos se muestran debajo:

Beta Lis-17			W	G	K	V	N	V	D
Beta Lis-66	K	A	H	G	K	V	L	G	A

Un péptido que tiene la sucesión, acetilado-amino (Ac-) Trp Gly Lys Val Leu Gly Gly fue preparado como un reland potencial. Este péptido, un híbrido construido de ambas sucesiones anteriores se usó a las concentraciones de 0.5 mg/ml en PBS pH 7.4 a temperatura ambiente en un tratamiento durante seis días con glucosa 0.5% para lograr la glicación. El péptido glicado se conjugó a la albúmina y se usó como reactivo fase sólida en un ensayo ELISA como sigue:

Las placas de micro-valoración fueron recubiertas con albúmina a 5 µg/ml a pH 7.4 en el buffer PBS durante la noche. La placa fue tratada entonces con carbodiimida (Sigma E6383) a una concentración de 10 µg/ml, y 100 µl de péptido glicado a 10 µg/ml fue adicionado y se le permitió reaccionar durante la noche. Ambos el clon A y el clon B limitados al péptido, y ninguno fue inhibido de ligar por la hemoglobina glicada. Esto demostró que el péptido glicado está limitado muy bien a los anticuerpos y por consiguiente no calificó como un reland.

Desde la glicación del péptido junto con la conjugación se creó un producto con una afinidad para el anticuerpo muy alta, el péptido no-glicado se seleccionó como el reland. El reland se marcó para los propósitos de la evaluación por conjugación a biotín para formar un conjugado reland-biotín. El producto se purificó por TLC y se probó para la habilidad de ligar los anticuerpos monoclonales anti-Hb Glc.

En particular, fue ensayada la habilidad del conjugado reland-biotín para ser liberado por Hb y Hb Glc. Un anticuerpo: el complejo reland se formó usando el Clon B, cuando el Clon B tenía el valor más alto. El reland-biotín se incubó separadamente con cada anticuerpo monoclonal Anti-Hb Glc. Después de la incubación durante 72 horas a 4 grados C, el conjugado no acomplexado reland-biotín, fue removido por ultra filtración usando Amicon CENTRICON-30 con una membrana de expansión de 30,000.

La descarga del reland por Hb glicada fue probada: al complejo preformado anticuerpo:reland se agregó Hb Ao (Sigma) o Hb Glc, seguido por incubación durante treinta minutos. Hb Ao (Sigma) se ha despojado de Hb A1C. Hb glicada se preparó desde Hb Ao (Sigma) por incubación con glucosa 0.5% a PBS pH 7.4 durante 7 días. La cantidad de descarga fue medida como sigue:

Siguiendo la incubación del complejo con el analito, la mezcla entera se transfirió a una placa recubierta con avidin donde todo el marcador de biotín aglutinaría, es decir, ambos complejos del anticuerpo el biotín liberado-reland y el biotín no liberado-reland. La cantidad del anticuerpo limitado a la placa detectado con el anticuerpo HRP fue proporcional a la cantidad de los conjugados biotín no liberado-reland aún acomplexados con el anticuerpo. Por consiguiente, una absorbancia baja es igual a un alto grado de descarga. Los datos se muestran en la Fig. 6. Estos datos muestran claramente mayor descarga por Hb Glc que Hb Ao.

La hemoglobina glicada fue capaz de liberar cantidad significativa del anticuerpo limitada al reland. Esta habilidad para discriminar entre la forma glicada y no glicada excedió significativamente la habilidad de estos clones de discriminar entre las dos formas en un ensayo convencional, como se muestra en la Figura 7.

Ejemplo 4

Ensayo de descarga para teofilina

Este Ejemplo reporta el desarrollo de un ensayo de descarga para la teofilina. La teofilina se usa en el tratamiento del asma. Tiene un rango terapéutico muy estrecho siendo muy poco no efectivo profilácticamente y demasiado altamente tóxico. Por consiguiente, los niveles de teofilina deben supervisarse cuidadosamente especialmente en los niños y en aquellas otras sustancias tomadas que podrían afectar el metabolismo de la teofilina.

Los candidatos para el reland fueron seleccionados escogiendo los compuestos de la lista de reactantes cruzados proporcionados por el proveedor del anticuerpo. El teobromo con 0.6% de reactividad cruzada reportada fue modificada (vea debajo) para permitir la unión a un marcador y fue evaluada por su reactividad cruzada en un Elisa competitivo para teofilina como sigue:

1-Acetil-teobromo (ThBr-1-Ac) se comparó con el teobromo (ThBr) en la habilidad de competir con el analito (en este caso, teofilina biotinilada (Th)) por ligar a la placa recubierta - anticuerpo en un formato convencional competitivo-Elisa (Fig. 10):

ES 2 265 646 T3

El anticuerpo monoclonal de anti-teofilina (teofilina 8) (OEM Concept, Toms River, NJ) fue recubierto sobre las placas de micro-valoración a concentración 8 ug/mL. Los micro pozos recubiertos por el anticuerpo fueron contactados con teobromo y 1-Acetil-teobromo a 0, 1, 10, 100, 1000 μ g/mL y teofilina-peroxidasa (de BiosPacific, Inc. Cat. #V57520) a una dilución 1:500. La reacción se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y después del lavado la actividad de la cantidad de peróxido limitado se detectó con Serex TMB diluido 1:20 en agua de-ionizada.

Como se muestra en la Fig. 10, el teobromo, pero no el teobromo-1-acetato, fue capaz de inhibir la liga de la teofilina al anticuerpo. Así, el teobromo-1-acetato no podía competir significativamente con el analito por ligar al anticuerpo, indicando su conveniencia potencial como un reland en un ensayo de descarga de la invención para la teofilina. También note el 20% de aumento en absorbancia observado a la concentración del reland de 1 y 10 ug/ml. Ésta normalmente es una propiedad asociada con los relands.

Los conjugados de biotina de un aglutinante de teofilina competitivo, 8-carboxipropildimetilxantina; (8-CP-teofilina) y reland de teofilina (teobromo-1-acetato) se sintetizaron como sigue:

19 mg de 8 CP-teofilina (Sigma C4041) y 18mg de ThBr-1-CA (sintetizado según Wolfes y Kornick Patente alemana No. 352980, 25 de abril de 1920) se convirtieron a sus ésteres activos por N-Hidroxisuccinamida y el dicitohexilcarbodiimida (ambos de Sigma). Los ésteres activados fueron interactuados con 10 mg de 5 - (biotinamido) penilamina (Pierce, No. 21345) disueltos en 0.6 ml de agua destilada a pH ajustado a 7 con bicarbonato de sodio. Ambos conjugados de biotin se purificaron por cromatografía preparatoria de capacidad que rinde productos homogéneos.

La formación compleja dependiente del tiempo de cada uno de los conjugados de biotin con el anticuerpo monoclonal de anti-teofilina (O.E.M. Concepts, Toms River, NJ) se evaluó. A las placas de micro-valoración previamente recubiertas con el anticuerpo monoclonal de anti-teofilina a 8 ug/mL en PBS pH 7.4, se adicionaron 10 uL de soluciones de 40 ug/mL, 1 ug/mL y 0.25 ug/mL de ligante biotinilado o reland y 90 uL del buffer de lavado (PBS + 0.06% Tween 20) Las placas se incubaron durante 0, 5, 60, 120, 240, 360, y 5400 minutos (90 horas), después de este tiempo las placas fueron lavadas. La cantidad de formación de complejo se determinó por adición de avidin-peroxidasa (2.2 mg/mL diluidos 1:80,000 en BSA - buffer de lavado) e incubado durante 30 minutos. El avidin-peroxidasa fue removido, la placa se lavó con PBS, y la cantidad de marcador de peróxido se detectó adicionando 150 uL de TMB por pozo. La reacción de la enzima se permitió que procediera durante 15 minutos, seguida de apagado con 50 uL de H_2SO_4 2N. La absorbancia se midió a 450 nm.

Los resultados se muestran en las Figuras 8A, 8B, y 8C. La Figura 8A (aglomeración de ligante y reland a 40 ug/ml) muestra que la aglomeración de los conjugados ligante-biotin fue esencialmente completa después de aproximadamente 5 minutos. Sin embargo la aglomeración del reland requirió 360 minutos. A menor concentración, Fig. 8B (1 ug/ml) y Fig. 8C 0.25 mcg/ml, la aglomeración de CP-teofilina fue esencialmente completa después de 5 minutos, pero la aglomeración estable del reland de teobromo-1-acetato requirió aproximadamente una semana de incubación. Note que ese tiempo no compensa completamente para la menor concentración.

Dependencia de la concentración de la formación reland receptor

Las placas de micro-valoración fueron recubiertas con anti-teofilina como fue descrito e incubadas con biotin-reland (teobromo-1-acetato) y biotin:ligante, 8-CP teofilina a concentraciones de 0.0005 ug/ml a 500 ug/ml (10 ul de Conjugado de biotin + 90 ul de PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. El biotin limitado se detectó por incubación con avidin peroxidasa (Jackson, PA) a 1:80,000 en PBS, 0.1% BSA .06% Tween. durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad de la enzima fue medida usando Serex TMB a 1:20 en agua de-ionizada durante 15 minutos y se detuvo la reacción con H_2SO_4 .2N. Se muestran los resultados en la Fig. 11. La aglomeración de ligante-biotin ocurre a 1 ug/ml ó 10^{-7} M, mientras el reland requiere >200 veces una concentración mayor de >250 ug/ml, es decir 4.6×10^{-4} . Nosotros observamos de forma consistente que el reland no liga eficazmente a menos que se suministre en una concentración en el rango de 10^{-8} a 10^{-3} M más preferentemente entre .5 - 5×10^{-4} .

Cinética de descarga y Estabilidad de los Complejos. Se evaluaron las cinéticas de descarga para estos conjugados de biotin, Figuras 9A y 9B. Los complejos de descarga se formaron como sigue:

para el anticuerpo recubierto (como anteriormente) sobre las placas de micro-valoración, 10 ul de cada conjugado de biotin a una concentración de 1 ug/ml para 8-CP-teofilina, ligante y 100 ug/ml para ThBr, reland, se incubaron con 90 ul de PBS, 0.06% Tween 20, pH 7.4, sobre la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa, teofilina estándar a 1 ug/ml o un control PBS fue adicionado. En los tiempos indicados desde 5 minutos hasta 90 horas, muestras de 75 ul fueron removidas y ensayadas para la descarga. La cantidad de biotin-ligante liberado o biotin-reland se detectó detectando la habilidad del biotin liberado para inhibir la aglomeración de biotin-peróxido de rábano picante (Jackson Immuno Research, PA) a 1:40,000 en PBS sobre una placa previamente recubierta con avidin (Sigma) recubierta a 10 ug/ml en PBS pH 7.4 durante la noche. La reacción de la enzima se corrió por 15 minutos y se detuvo con H_2SO_4 .2N. La absorbancia fue leída a 450 nm.

ES 2 265 646 T3

El control PBS muestra que para ambos el ligante y el reland hubo pérdida de aglomeración durante los primeros treinta minutos pero ninguna durante las restantes 90 horas. Este tiempo de treinta minutos durante el cual hay pérdida espontánea puede representar el tiempo durante el cual el anticuerpo:ligante ó el anticuerpo:reland está asumiendo una conformación más estable con una velocidad de disociación inferior a la del complejo inmune inicial. Esto indica que la constante de disociación (Kd) del reland y del ligante son similares y son ambas muy bajas en contraste a Freytag quien especifica una diferencia en el Kd.

Cuando un complejo de ligante, 80-CP-teofilina, fue contactado con 1 ug/ml de teofilina, la descarga significativa tomó 30 minutos, con descarga adicional a lo largo de las 90 horas (Figura 9A). En contraste, la descarga completa de ThBr fue casi instantánea y requirió menos de 5 minutos: y ninguna descarga adicional ocurrió, confirmando que para ThBr, el reland, la descarga es independiente de Kd.

Ejemplo 5

Detección de teofilina usando glucosa apo oxidasa en el sistema de detección para un ensayo de descarga

El reland de teofilina usado fue teobromo-1-acetato, acoplado a FAD como sigue:

A 24 mg de teobromo-1-acetato disueltos en 1 ml de dimetilformamida se adicionaron 13 mg de N-hidroxisuccinamida y 25 mg de dicitclohexil carbodiimida. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, el teobromo-1-acetato activado se mezcló con N⁶ amino hexil-FAD, sintetizado según el método de Carrico & Johnson (EE.UU. Patente No. 4,255,566) en buffer de carbonato 0.1M pH 9. Siguiendo a la reacción durante la noche, la preparación cruda fue purificada por el preparado TLC en un sistema de solvente de etanol/1M bicarbonato de trietilamonio (9:1). La concentración final de conjugado reland-FAD fue determinada por espectrofotometría usando el coeficiente de absorción molar de FAD a A450 nm.

Anti-Teofilina (Bioscience Resource Project, ME) teniendo una reactividad cruzada con teobromo-1-acetato FAD de menos de 0.01% fue inmovilizada en la gel de agarosa Proteína G (1 mg Ab a 0.4ml de agarosa Proteína G) por mezcla lenta que se invierte en una mecedora a 4 grados C durante la noche, seguida por dos lavados por centrifugación.

Condiciones para aglomeración del reland

30 ul de gel fueron distribuidos en los pozos de un dispositivo de Filtración Mili poro a las concentraciones siguientes. 3.35×10^{-6} M anticuerpo/pozo 6.7×10^{-6} M los sitios aglutinantes) y se llevó a una concentración del reland de 2.9×10^{-4} M, 3.8×10^{-5} M, ó 3.8×10^{-6} M. Se permitió que el Reland-FAD aglutinara durante 2 horas a temperatura ambiente y entonces la gel fue lavada intensamente seguido por aspiración para remover el reland-FAD no limitado.

Detectando el límite reland/FAD por Ab

A. El complejo anticuerpo:reland-FAD se detectó agregando 40 ul de 1 mg/ml ApoGo, incubando con agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos. ApoGO limitó al FAD del complejo. ApoGO no limitado fue removido por aspiración, la cantidad de ApoGO limitado fue determinada por adición a los pozos de 20 us peróxido del rábano picante (2.5 ug/ml) y 50 ul de TMB/glucosa (w0.5 mg TMB/ml + 500 mg gluc/ml). A los dos minutos el fluido se aspiró y se leyó la absorbancia a A620 nm en un lector de micro-valoración STL. 50 ul de H₂SO₄.2N, se agregaron y la absorbancia a A450 nm fue leída:

Concentración molar de Reland.FAD	Absorbancia a 450 nm
0	0.09
3.8×10^{-6} M	0.09
3.8×10^{-5} M	0.15
2.9×10^{-4} M	0.83

A 2.9×10^{-4} concentración molar, ocurre aglomeración significativa. Debajo de 10^{-4} , ninguna aglomeración significativa ocurre como se describió en Ejemplo 4.

B. Para determinar los límites del rango dinámico del sistema de detección para FAD-reland, 60 ul de reland-FAD fueron agregados directamente a la solución de detección ApoGO y se permitió reaccionar durante 3 minutos antes de detener con ácido como anteriormente, y se leyó la absorbancia a 450 nm:

ES 2 265 646 T3

Concentración M de Reland:FAD	A _{450 nm}
2.4 x 10 ⁻⁶	>2.0
2.4 x 10 ⁻⁷	0.959
2.4 x 10 ⁻⁸	0.204
2.4 x 10 ⁻⁹	0.140
0	0.126

El fondo es muy bajo. El rango de detección del ensayo es 10⁻⁹ - 10⁻⁶M dentro de los tiempos que son los usables para un ensayo *in-situ*, por ejemplo, diez minutos.

C. Para evaluar la descarga, el complejo inmune se realizó como sigue:

El reland-FAD interactuó con la anti-teofilina que recubrió la agarosa como anteriormente usando una concentración del reland de 1.9 x 10⁻⁴M y una concentración del anticuerpo de 5.15 x 10⁻⁶M. El exceso de reland-FAD fue removido por centrifugación y con lavados intensos. Las perlas de complejo inmune recubierto por agarosa fueron distribuidas en 8 pozos de la placa de filtración descrito anteriormente y aspiradas. El ensayo de descarga se realizó agregando a las perlas 60 ul de teofilina estándar (teofilina Sigma T-1633d) en PBS pH 7.4 e incubando 10 minutos con agitación. El reland liberado se aspiró, y entonces se midió para su habilidad de activar al ApoGO como sigue:

A 60 ul de aspirante se adicionaron 30 ul de ApoGO a 1.5 mg/ml 25 ul de peróxido del rábano picante a 2.5 ug/ml y 50 ul de TMB/Glucosa (0.5 mg TMB por ml + 500 mg de glucosa por dl). La reacción se detuvo en 3 minutos con 50 ul H₂SO₄.2N y se leyó la absorbancia a A450nm.

Resultados de la descarga

Concentración de teofilina	A _{450nm}
10 ug/ml (5.4 x 10 ⁻⁵ M)	1.571
1 ug/ml (5.4 x 10 ⁻⁶ M)	1.425
.5 ug/ml (2.7 x 10 ⁻⁶ M)	1.324
0	0.548

Note que la descarga completa se observa a 0.5 ug/ml. La sensibilidad de la prueba está entre 10⁻⁷ y 10⁻⁶M y esa descarga máxima se logra cerca de 10⁻⁶M indicando que a 2.7 x 10⁻⁶M todo el FAD-reland ha sido liberado. Se estimó que 30 ul de perlas recubiertas en la mezcla de la reacción tiene un máximo de 5.5 x 10⁻⁶M de Ab de tal forma que la máxima capacidad del reland sería aproximadamente 10 x 10⁻⁶ indicando además que la descarga fue completa, es decir ese reland fue 100% liberado. El complejo anterior podía guardarse durante varios días sin cambio en la reactividad.

El mismo sistema del reactivo se usó sobre una membrana de nylon Pall Biodyne B y se leyó visualmente para lograr resultados similares. En el formato membrana el complejo inmune está separado del ApoGO por separación física sobre la membrana, en la misma superficie, o poniendo algunos reactivos en la superficie contraria. Por ejemplo, nosotros hemos demostrado que las biomembranas Pall pueden impregnarse sobre cualquier lado sin la penetración al otro lado, así, proporciona separación física o a través del uso de una segunda membrana en contacto con la primera. Como el FAD-reland es liberado por el analito, éste migra hacia los ApoGO y otros reactivos de detección y genera un color directamente proporcional al reland/FAD liberado y a la concentración de analito.

Discusión del formato heterogéneo

Mientras los sistemas de ensayo que involucran la disociación de complejos preformados anticuerpo-ligante (Cocola y otros, 1979, Analytical Biochem. 99:121-8-Hinds y otros, 1984, Chin.Chem 30:1174-8; Hinds y otros, 1985, Chin.Chem.Acta 149:10-15) han utilizado ligantes competitivos como socios aglomerantes, el ensayo de descarga de la invención es un sistema no-competitivo. Esto se demuestra en la Tabla 4, arriba, donde se muestra que el reland no compete. También es notable que a diferencia del ensayo de descarga de la presente invención, los ensayos de disociación competitivos descritos por Cocola y otros, Hinds y otros, 1984 y Hinds y otros, 1968, arriba, no muestran tener ventaja significativa sobre otros métodos competitivos de inmunoensayo. Aunque la presente invención no está limitada por cualquier teoría particular, nosotros suponemos que los lazos del anticuerpo a la descarga del ligante son vía la interacción de afinidad muy baja, y en la ausencia de afinidad más alta de los socios aglomerantes, el anticuerpo sufre un cambio en la conformación a un complejo meta-estable que es liberable. El complejo puede hacerse muy estable, como se observa con los conjugados convencionales del aglutinante. Por ejemplo, N-isopropil-narcotinina fue diseñado para proporcionar un grupo voluminoso a un sitio no-inmunológico crítico para permitir la descarga después de la formación de un complejo estable.

Conclusión

Nosotros hemos desarrollado un método de ensayo que utiliza la habilidad de los receptores de asumir un ataque inducido con un socio aglutinante para el cual tiene afinidad muy baja, es decir, el ligante liberador, o reland. El ensayo de descarga proporciona un complejo estable preformado receptor:reland que puede disociarse rápidamente en la presencia de analito. El sistema de descarga puede usarse en todos los formatos de inmunoensayo. El ensayo de descarga tiene ventajas inherentes sobre los ensayos convencionales o asociativos.

1. Por eliminar una etapa en la reacción inmune, la descarga ahorra tiempo en etapas y posibles fuentes de error, con lo cual, acorta el tiempo de ensayo y simplifica las técnicas de ensayo.

2. La descarga, es decir, disociación, está inherentemente menos sujeta a interferencia haciendo a ésta más exacta.

3. La habilidad de monitorear todo el anticuerpo en el ensayo reduce ruido y hace posible un rango de sensibilidad de 1000-10,000-veces. Esta metodología, usando marcadores más sensibles, extiende el rango teórico de ambos superior e inferior del disponible en los formatos del ensayo convencional. La adición de más reactantes no baja la sensibilidad como en inmunoensayos convencionales, pero extiende el rango superior de sensibilidad.

4. Una ventaja importante de la descarga son las condiciones suaves bajo las cuales ocurre la disociación.

5. El rango grande, la correlación positiva con presencia de analito, y el ruido bajo del sistema indican que el formato del ensayo de descarga puede usarse para discriminar entre muchos analitos en una mezcla de la reacción.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un ligante liberador para usar en un ensayo, donde el ligante liberador forma un complejo con un receptor que liga un analito a ser detectado aún cuando el receptor está limitado al ligante liberador, incluyendo la identificación de los compuestos monoméricos y multiméricos que se relacionan estructuralmente al analito, discriminando los compuestos para identificar compuestos que ligan al receptor, e identificando los compuestos que ligan al receptor pero no se reasocian con el complejo receptor-analito, para seleccionar los compuestos monoméricos que ligan al receptor con una constante de asociación del 1% o menos de la constante de asociación del analito para el receptor, y los compuestos monoméricos y multiméricos que tienen una constante de asociación para el receptor que es menos que o igual a 10^5 M^{-1} , y no compiten perceptiblemente con el analito por ligar al receptor, y donde el complejo dado ligante liberador-receptor tiene una constante de disociación similar a la del complejo receptor-analito.
2. El método de la reivindicación 1, en el que los compuestos se preparan sintetizando los analitos con una o más substituciones en la estructura química.
3. El método de la reivindicación 1, en el que los compuestos se preparan aislando el epítipo del analito limitado por el receptor, y modificando el epítipo para alterar las propiedades del aglutinante.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la constante de asociación del ligante liberador monomérico está entre 10^3 y 10^5 M^{-1} .
5. Un método para obtener un complejo receptor-ligante liberador incluyendo un receptor limitado a un ligante liberador monomérico o multimérico que está estructuralmente relacionado a un analito, siendo capaz el receptor de ligar al analito aún cuando el receptor está limitado al ligante liberador, y siendo capaz la forma monomérica del ligante liberador de ligar al receptor con una constante de asociación de 1% o menos de la constante de asociación del analito para el receptor, en el que la forma monomérica del ligante liberador tiene una constante de asociación para el receptor menor que o igual a 10^5 M^{-1} , el ligante liberador no compete perceptiblemente con el analito por ligar al receptor y no se reasocia con un complejo receptor-analito, y el complejo dado tiene una constante de disociación similar a la de un complejo receptor-analito; el método incluyendo las etapas de
 - a) obtener el ligante liberador usando un método acorde a la reivindicación 1;
 - b) incubar el ligante liberador con el receptor.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la constante de asociación del ligante liberador monomérico está entre 10^3 y 10^5 M^{-1} .
7. El método de la reivindicación 6, en el que la forma monomérica del ligante liberador liga al receptor con una constante de asociación de 0.2% o menos de la constante de asociación del analito para el receptor.
8. El método de la reivindicación 5, en el que el ligante liberador es marcado con una identificación que se hace perceptible después de la descarga del ligante liberador desde el receptor.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el receptor es un anticuerpo o fragmento del anticuerpo.
10. El método de la reivindicación 1, en el que el receptor se inmoviliza.
11. El método de la reivindicación 1, en el que el ligante liberador tiene un peso molecular de menos de 5,000 Daltons.
12. Un método por ensayar para la presencia o cantidad de un analito en una muestra que comprende:
 - a) poner en contacto un complejo receptor-ligante liberador obtenido según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, con una muestra, sospechosa de contener el analito a ser detectado; y
 - b) detectar la disociación del ligante liberador desde el complejo receptor como una medida de la presencia o cantidad de analito en la muestra.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el ligante liberador es marcado con una designación perceptible después de la descarga del ligante liberador desde el receptor, en el que la cantidad límite del analito es proporcional a la cantidad de marcador detectada.
14. El método de la reivindicación 12, que comprende además previo a la etapa
 - a) contacto del ligante liberador con el receptor en la ausencia del analito.

ES 2 265 646 T3

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, incluyendo además la inmovilización del complejo hacia una fase sólida del soporte.

5 16. El método de la reivindicación 15, en el que la fase sólida sobre la cual el complejo se inmoviliza incluye una membrana que abarca un campo de la reacción conteniendo una zona del indicador, en el que el complejo receptor-ligante liberador se localiza en el campo de la reacción, y al menos parte de los medios de detección para indicar la presencia o cantidad de receptor o ligante liberador en la disociación desde el complejo ligante liberador-receptor se localiza en la zona del indicador.

10 17. El método de la reivindicación 15, en el que los complejos ligante liberador-receptor para analitos múltiples, son inmovilizados.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1A

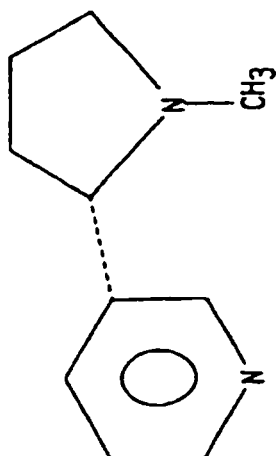


FIG. 1B

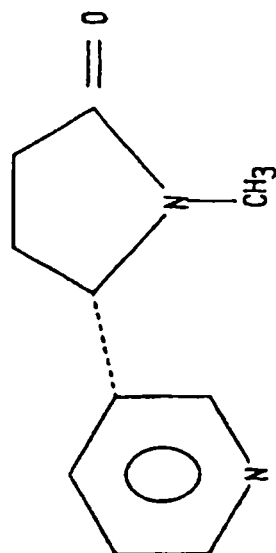


FIG. 1C

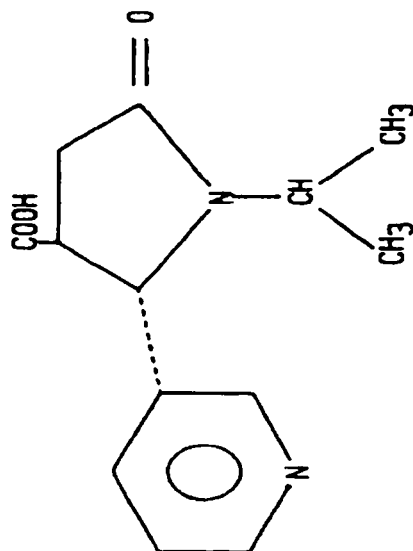


FIG. 1D

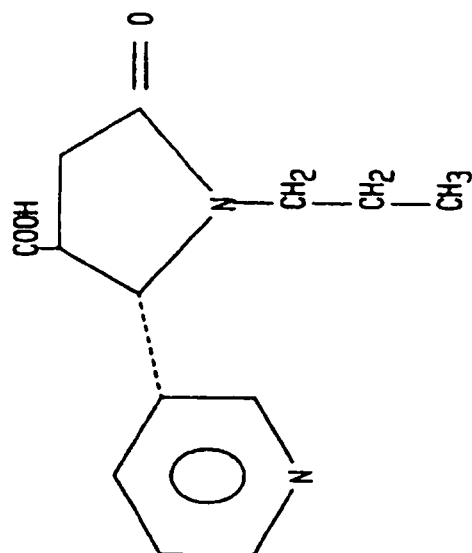
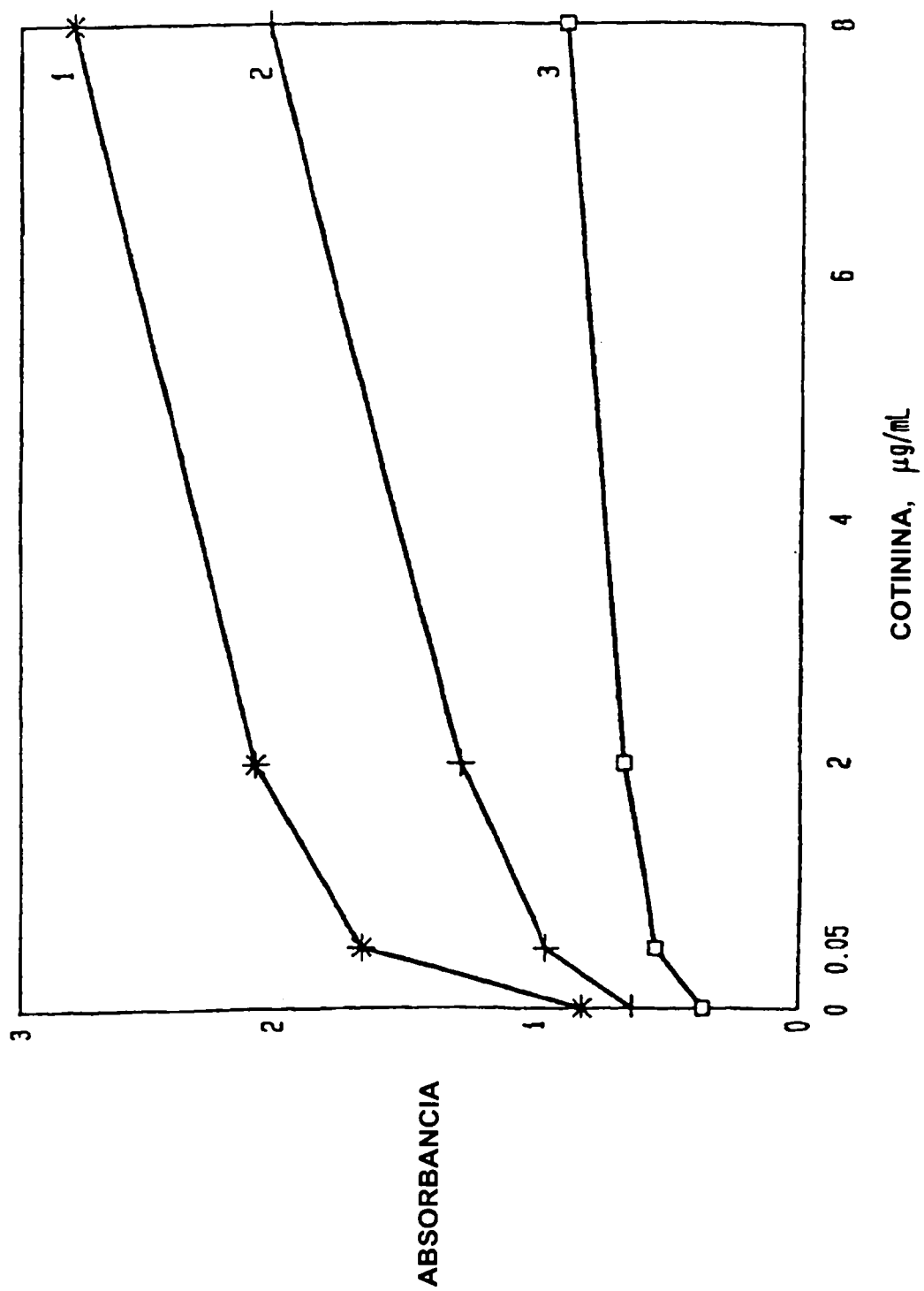


FIG. 2



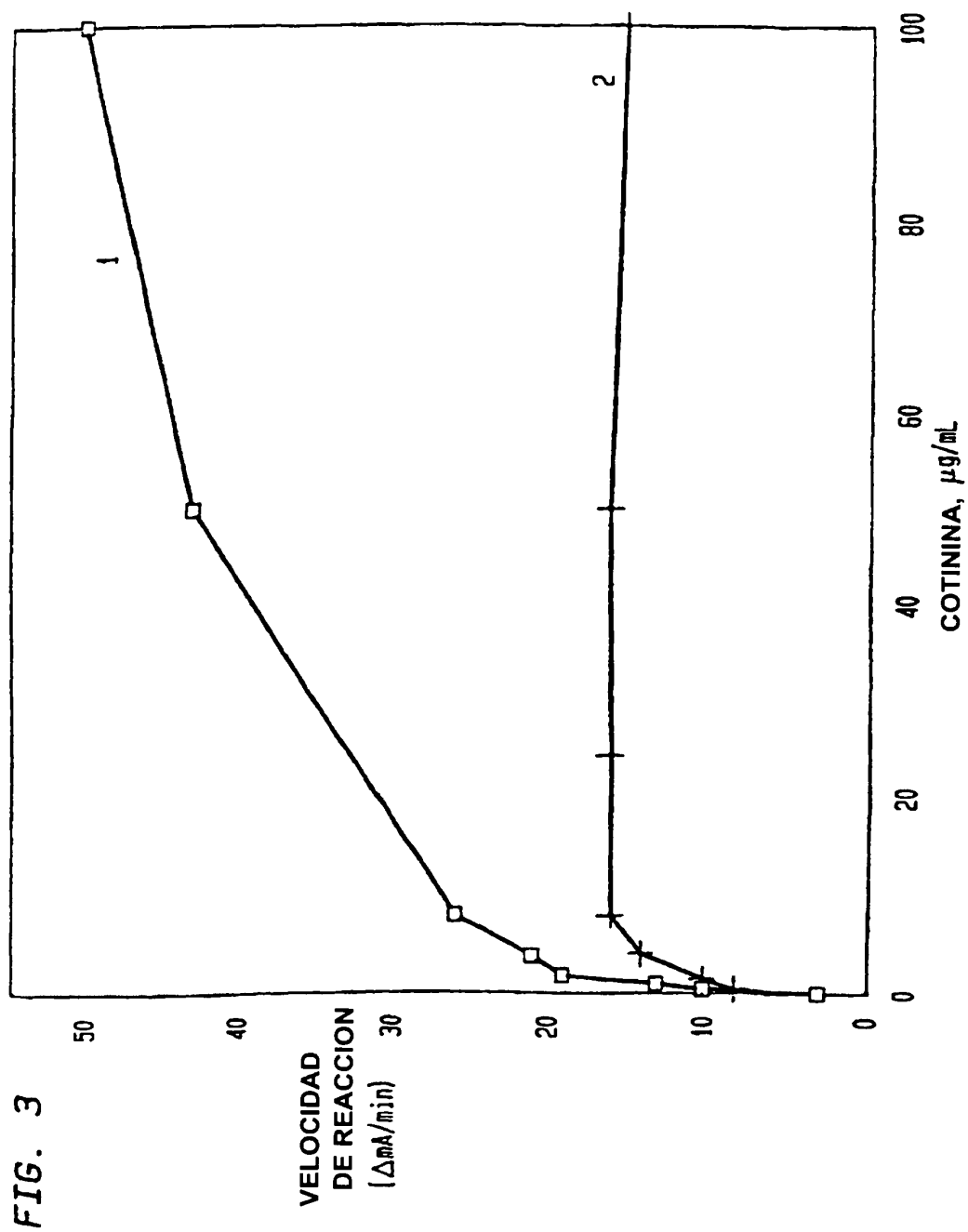


FIG. 4

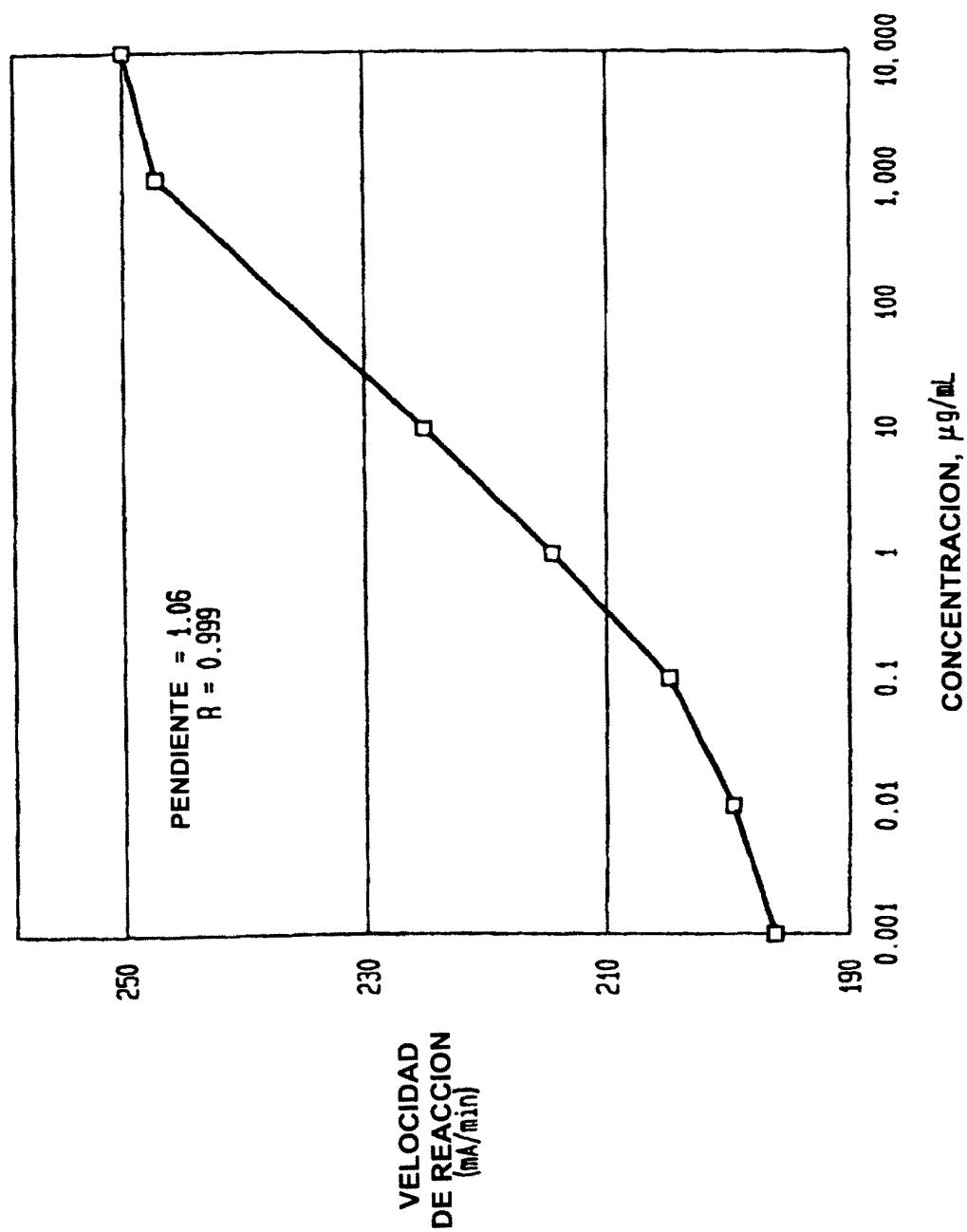


FIG. 5

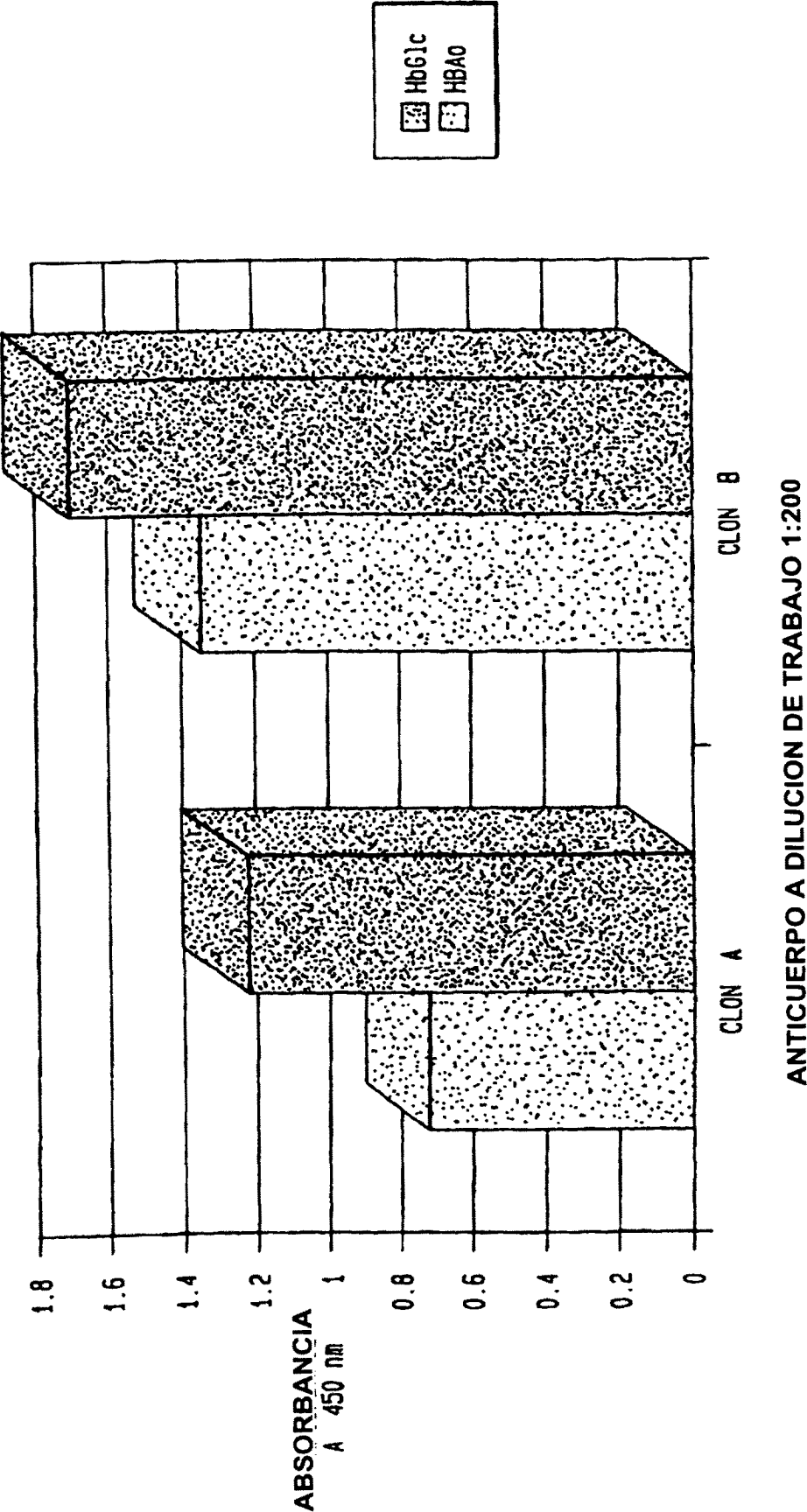


FIG. 6

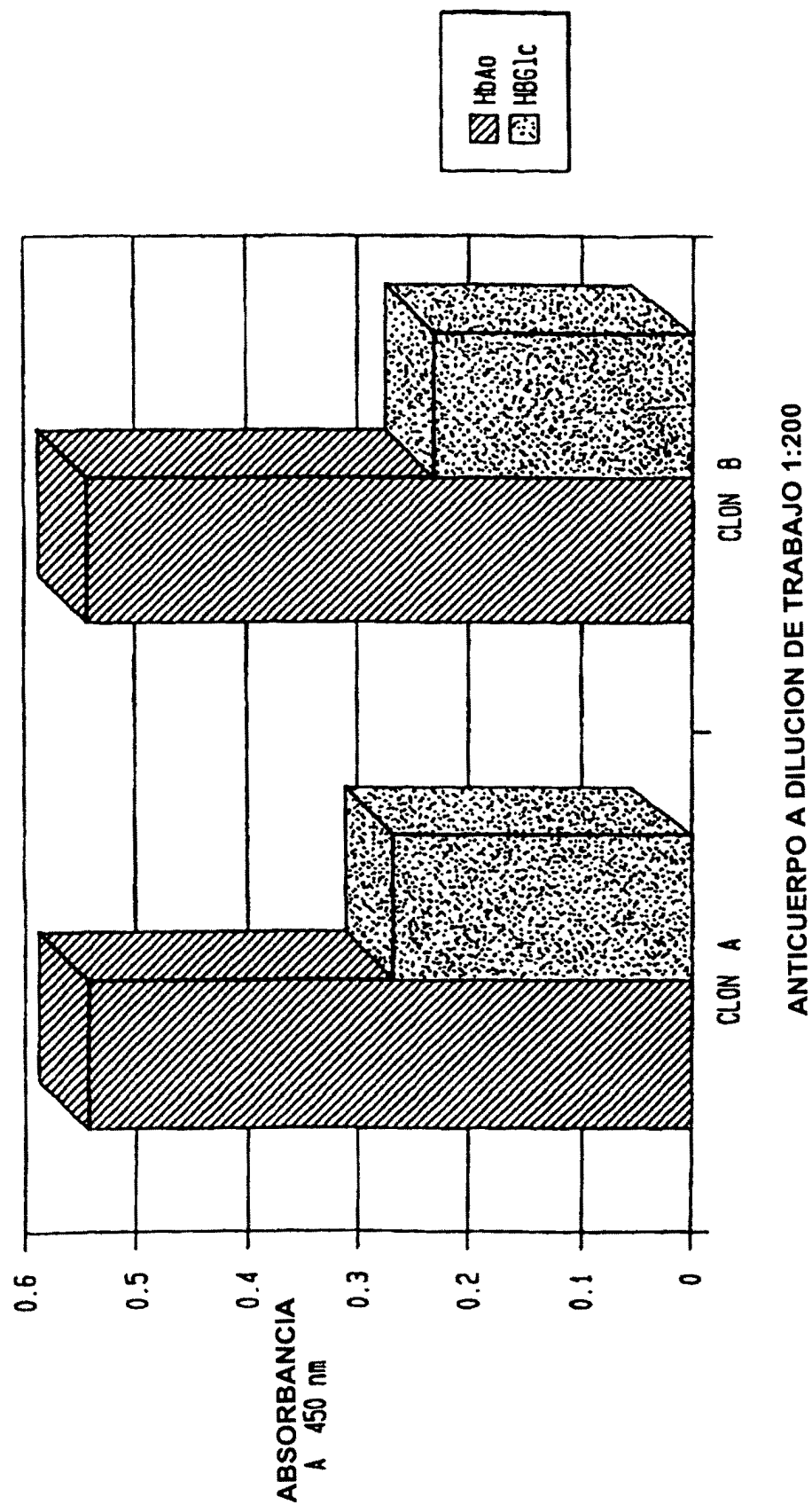


FIG. 7

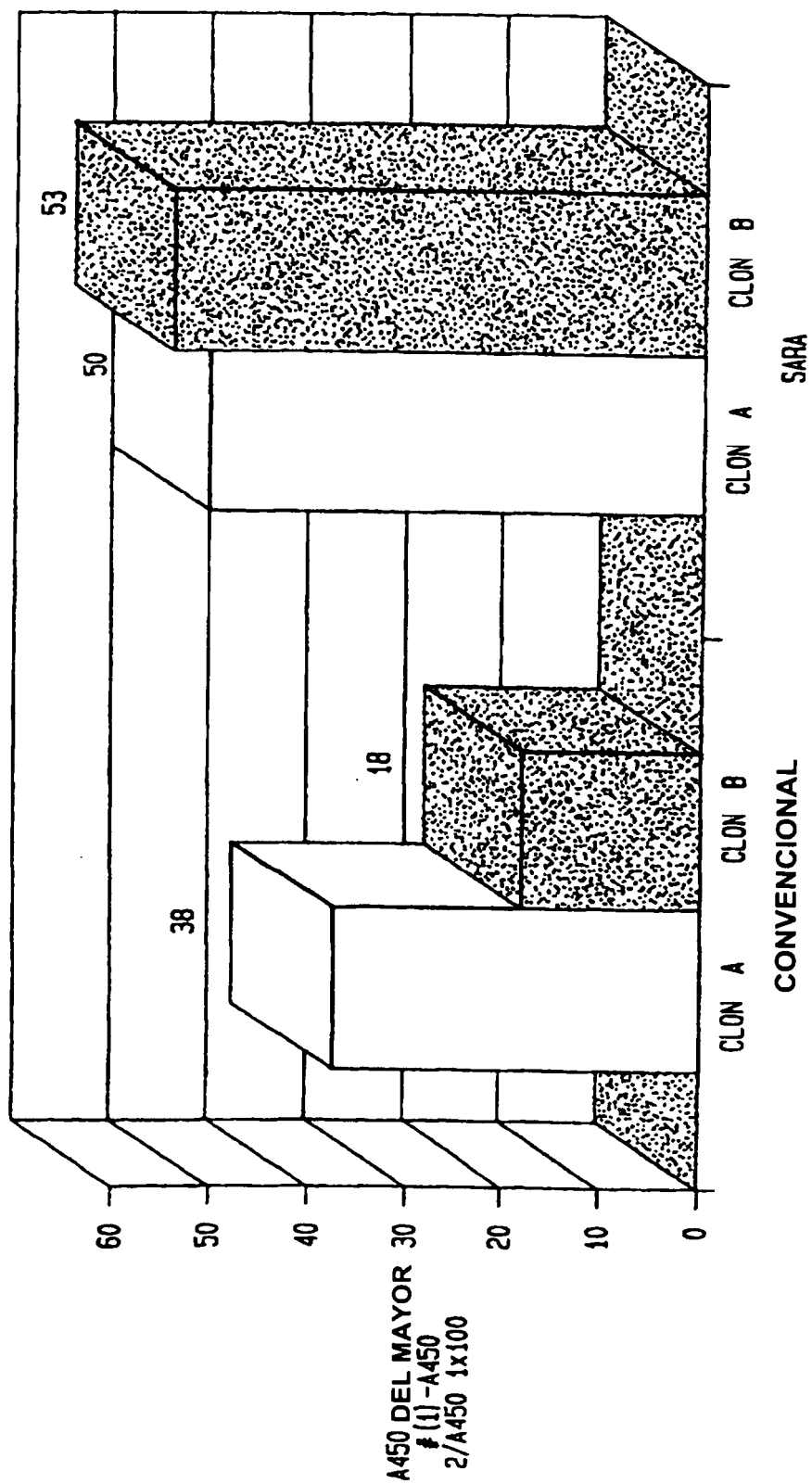


FIG. 8A

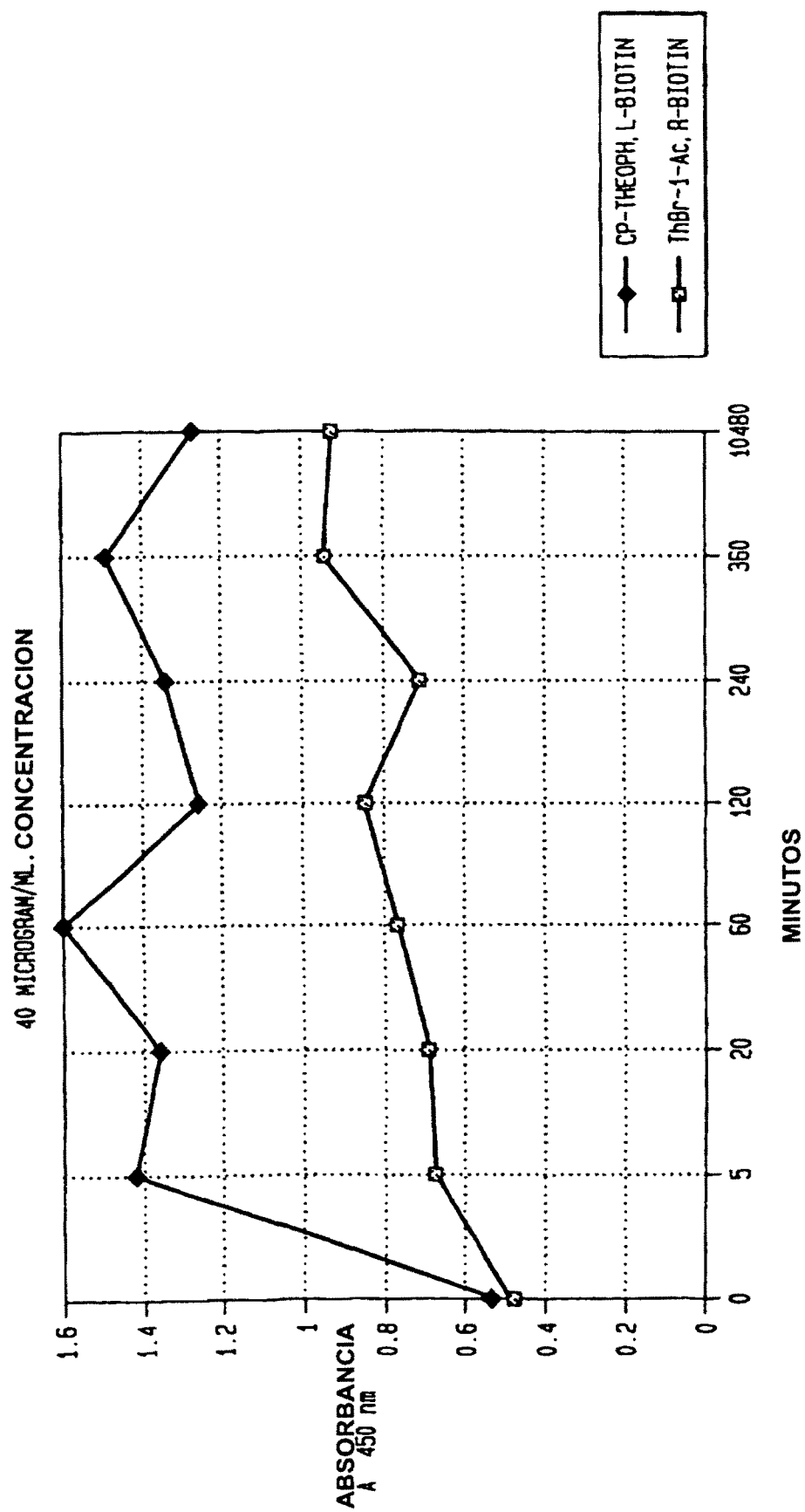


FIG. 8B

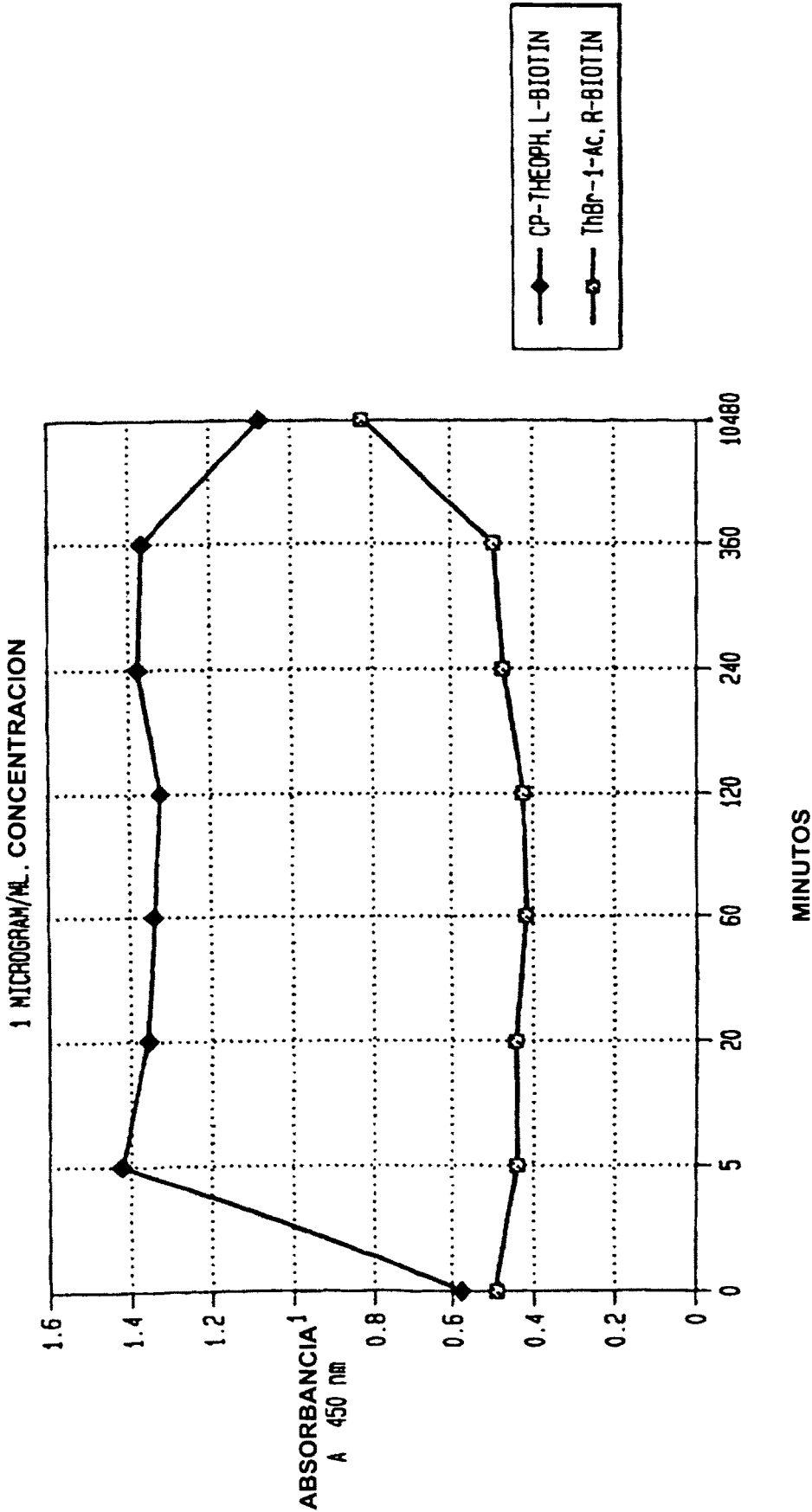


FIG. 8C

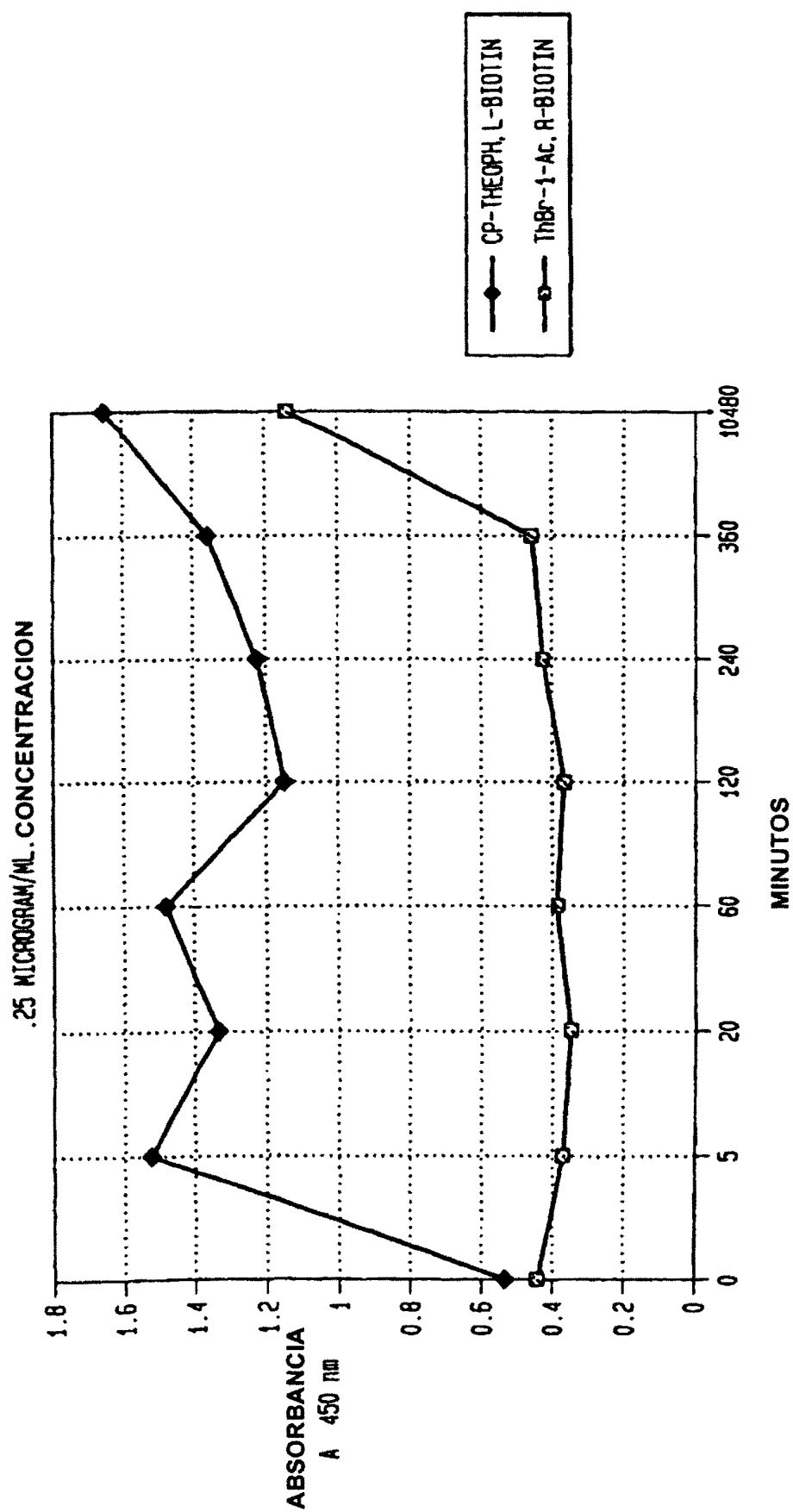


FIG. 9A
DESCARGA DE 8-CARBOXIPROPIL TEOFILINA
(L-8101)

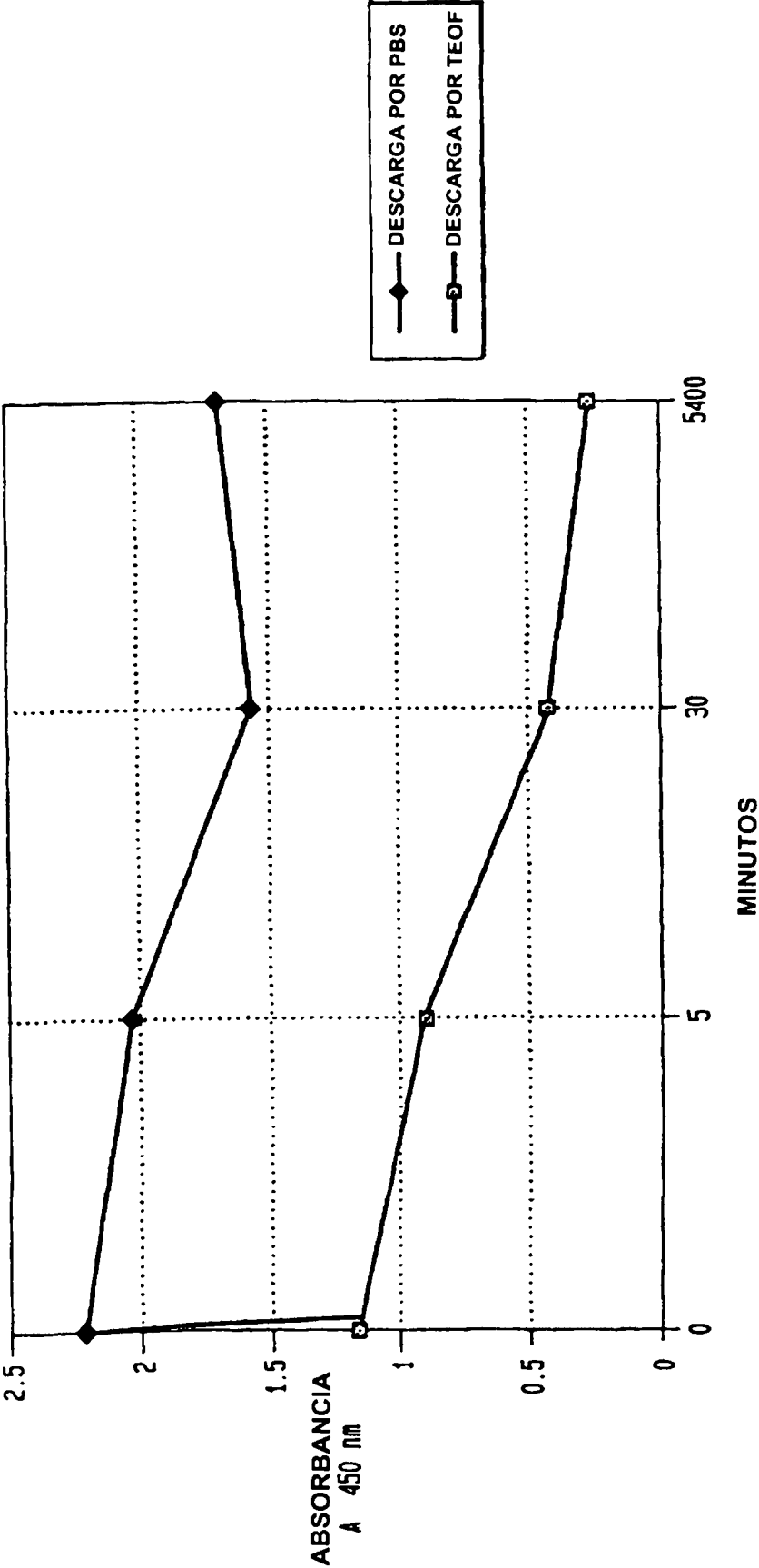


FIG. 9B
DESCARGA DE 1-ACETIL TEOBROMO
(R-810T)

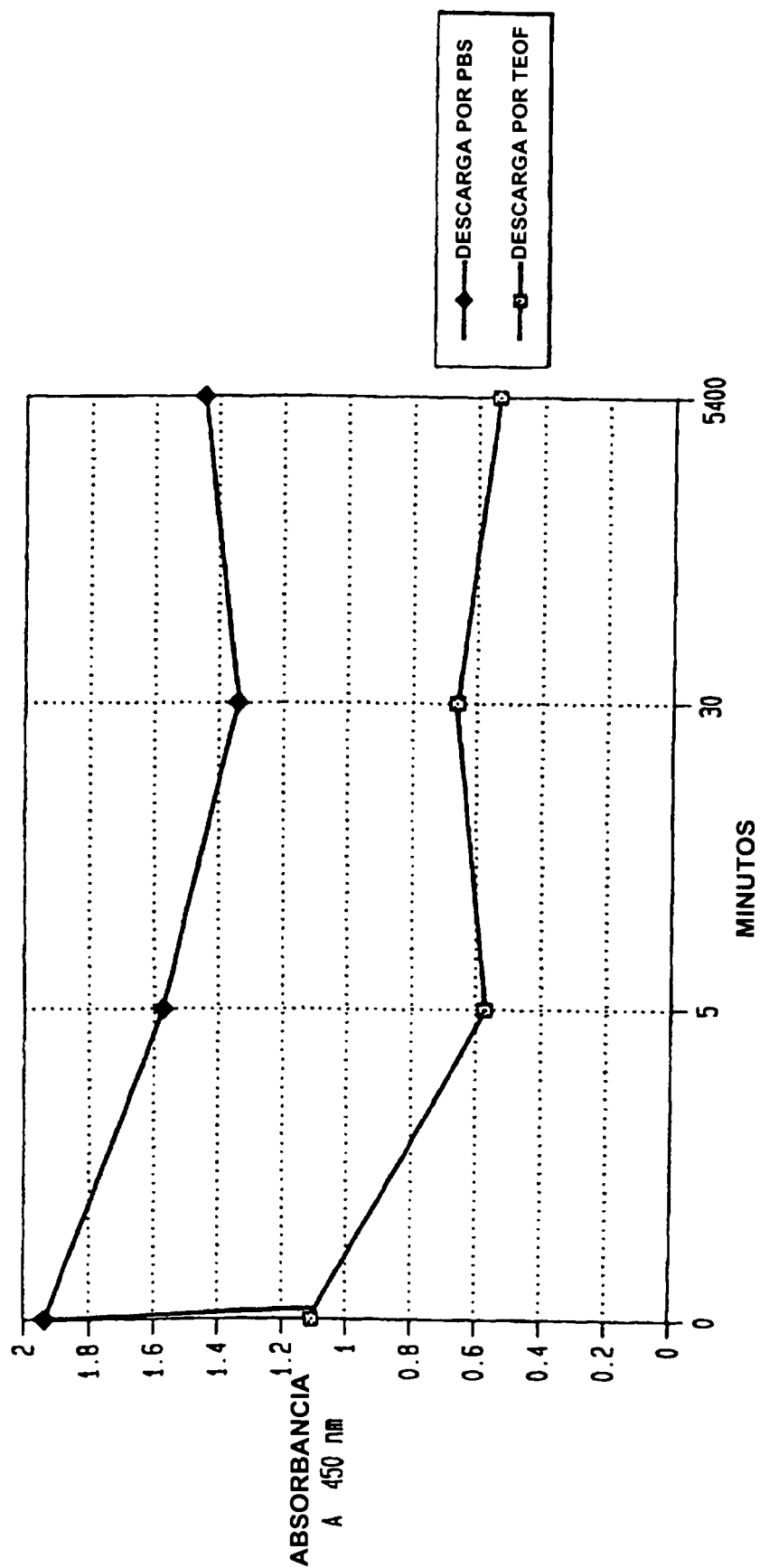
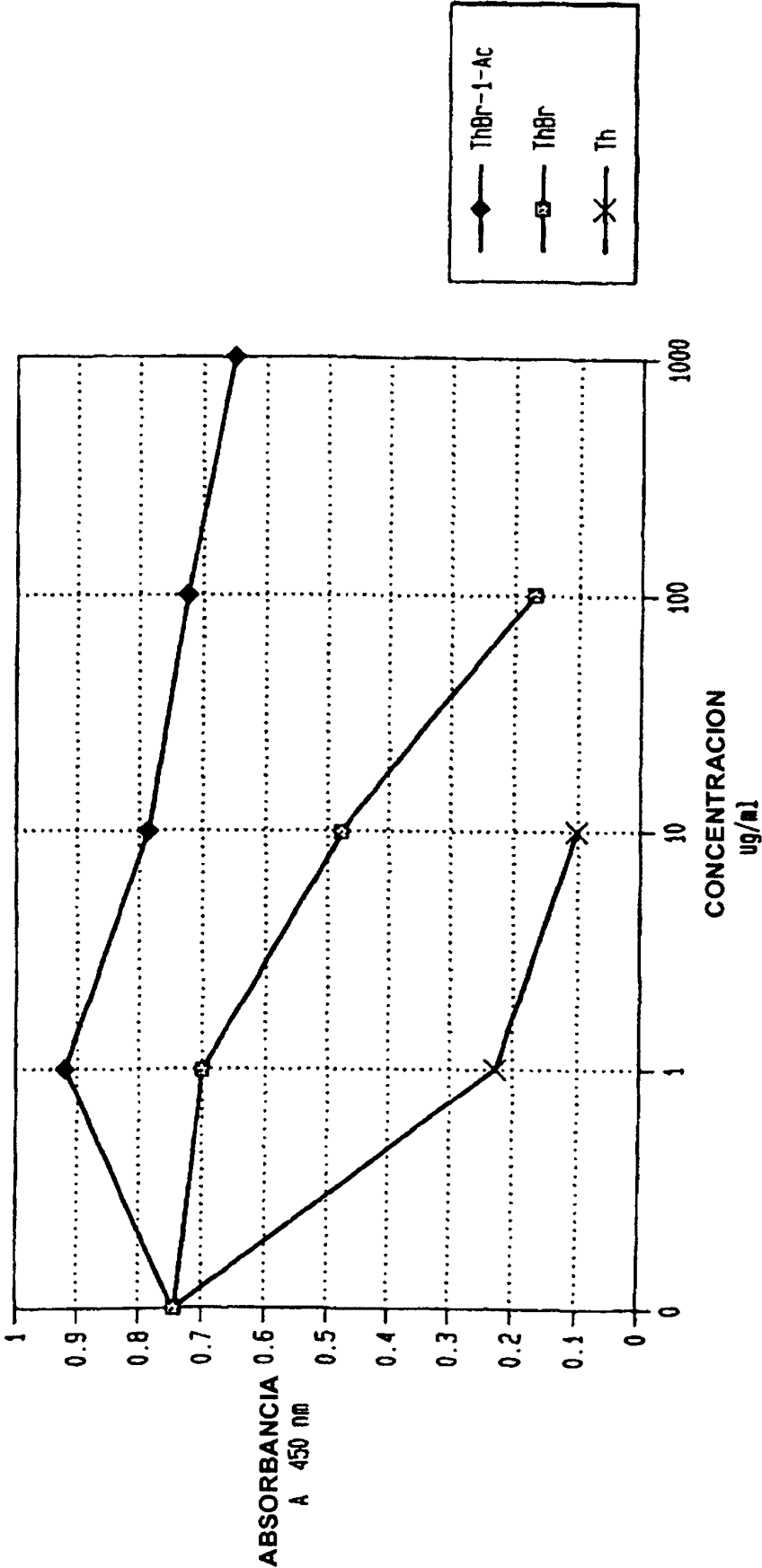


FIG. 10
INHIBICION POR TEOBROMO Y TEOBROMO-1-ACETATO



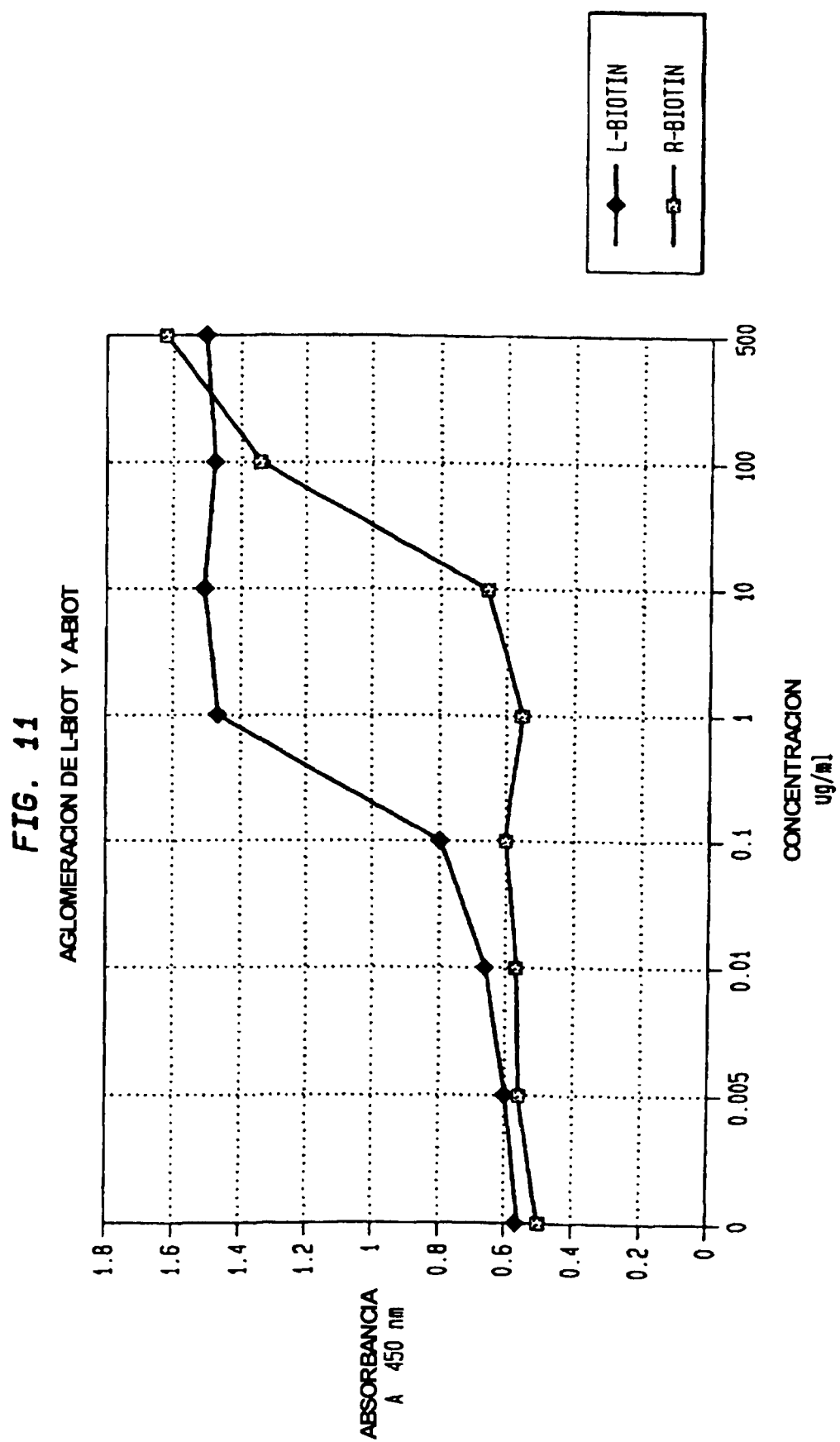


FIG. 12
AGLOMERACION DE ANALOGOS DE PIRIDINA

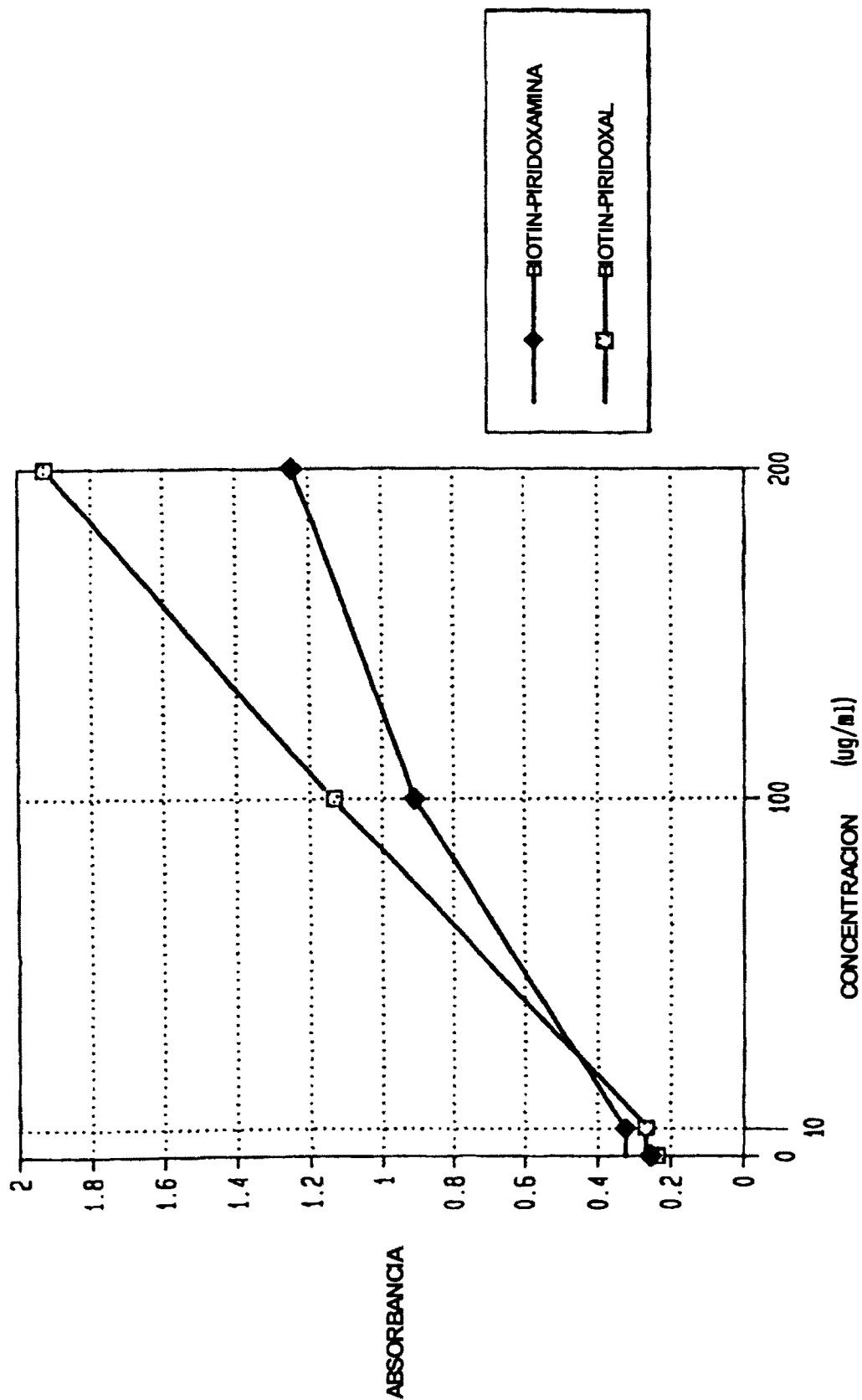


FIG. 13
DESCARGA DE PIRIDOXAL BIOTINILADO

