

(22) Data de pedido: **2006.01.17**

(30) Prioridade(s): **2005.01.21 US 40887**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.11.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.07.25**
184/2012

(73) Titular(es):

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
1717 DEERFIELD ROAD DEERFIELD, IL 60015

US

(72) Inventor(es):

ALAN ROBERT CRAIG

US

ZHU TENG

US

RICHARD C. WRIGHT

US

CHENGRONG WANG

US

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA

RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES PARA UTILIZAÇÃO COMO COMPONENTE DE GERAÇÃO DE SINAL E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DAS MESMAS**

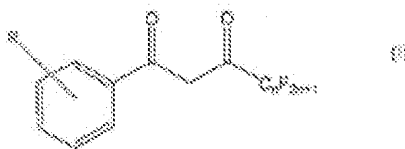
(57) Resumo:

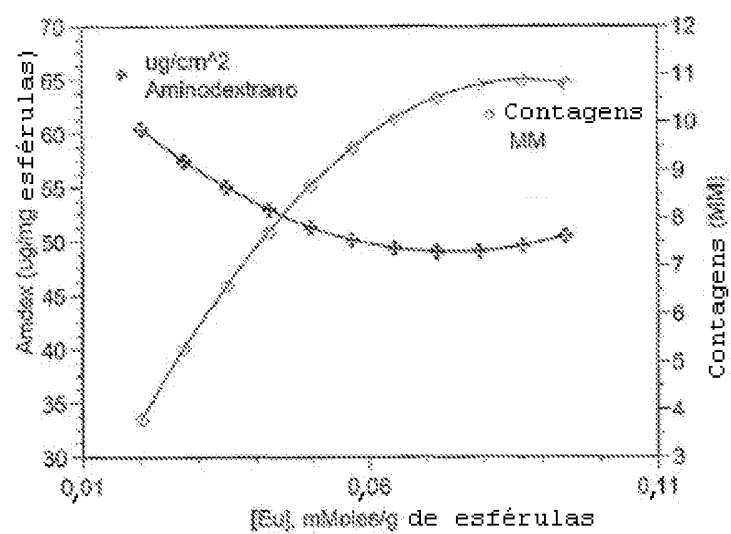
COMPOSIÇÕES ADEQUADAS PARA UTILIZAÇÃO COMO COMPONENTES DE GERAÇÃO DE SINAL DE UM IMUNOENSAIO, E MÉTODOS PARA A SUA UTILIZAÇÃO. DE ACORDO COM UM ASPETO DA INVENÇÃO, A COMPOSIÇÃO INCLUI UM TRANSPORTADOR POSSUINDO UM REVESTIMENTO DE UM AMINODEXTRANO E UM QUELATO METÁLICO AÍ INCORPORADO. O QUELATO METÁLICO ESTÁ PRESENTE NA QUANTIDADE DE PELO MENOS 0,065 %M POR MILIGRAMA DE TRANSPORTADOR, E A DENSIDADE MÉDIA DO REVESTIMENTO DE AMINODEXTRANO É PELO MENOS CERCA DE 45 %G POR MILIGRAMA DE TRANSPORTADOR. NOUTRO ASPETO DA INVENÇÃO, O TRANSPORTADOR É CORADO COM UM COMPLEXO POSSUINDO A FÓRMULA: M(L1)X(L2)Y, EM QUE M É UM METAL SELECIONADO DO GRUPO QUE CONSISTE EM EURÓPIO, TÉRBIO, DISPRÓCIO, SAMÁRIO, ÓSMIO E RUTÉNIO; L1 É UM LIGANDO SELECIONADO DO GRUPO QUE CONSISTE EM DPP, TOPO, TPPO; L2 COMPREENDE UM LIGANDO QUE TEM A FÓRMULA (1) EM QUE R CONSISTE NUM OU MAIS SUBSTITUINTES, EM QUE CADA SUBSTITUINTE COMPREENDE UM GRUPO DADOR DE ELETRÕES; N = 2-10; X = 1-2; E Y = 2-4.

RESUMO

"COMPOSIÇÕES PARA UTILIZAÇÃO COMO COMPONENTE DE GERAÇÃO DE SINAL E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DAS MESMAS"

Composições adequadas para utilização como componentes de geração de sinal de um imunoensaio, e métodos para a sua utilização. De acordo com um aspeto da invenção, a composição inclui um transportador possuindo um revestimento de um aminodextrano e um quelato metálico aí incorporado. O quelato metálico está presente na quantidade de pelo menos 0,065 μM por miligrama de transportador, e a densidade média do revestimento de aminodextrano é pelo menos cerca de 45 μg por miligrama de transportador. Noutro aspeto da invenção, o transportador é corado com um complexo possuindo a fórmula: $\text{M}(\text{L1})_x(\text{L2})_y$, em que M é um metal selecionado do grupo que consiste em európio, térbio, disprósio, samário, ósmio e ruténio; L1 é um ligando selecionado do grupo que consiste em DPP, TOPO, TPPO; L2 compreende um ligando que tem a fórmula (1) em que R consiste num ou mais substituintes, em que cada substituinte compreende um grupo dador de eletrões; $n = 2-10$; $x = 1-2$; e $y = 2-4$.





DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES PARA UTILIZAÇÃO COMO COMPONENTE DE GERAÇÃO DE SINAL E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DAS MESMAS"

DOMÍNIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se genericamente a composições úteis como componentes de geração de sinal em imunoenaios. Em particular, a invenção refere-se a composições que proporcionam, simultaneamente, um sinal forte e uma especificidade aumentada para os analitos de interesse.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os reagentes de imunoenaios têm uma funcionalidade que pode ser separada em dois grandes componentes: a funcionalidade de geração de sinal (também conhecida como amplificação), e a funcionalidade de ligação de ligandos. A funcionalidade de geração de sinal é requerida para a detecção da ligação de ligandos ao analito, e a funcionalidade de ligação de ligandos consiste na especificidade do reagente para o analito. A atividade de ligação de ligandos é obtida pela ligação covalente de ligandos à superfície das partículas. Anticorpos e pequenos haptenos com importância biológica, como tiroxina, são exemplos de ligandos comuns.

Composições fluorescentes e quimioluminescentes têm sido extensamente utilizadas em componentes de geração de sinal de imunoenaios. Um componente de geração de sinal típico inclui um transportador, como uma partícula de látex, corado com uma composição fluorescente ou quimioluminescente. Em particular, quelatos metálicos têm sido extensamente utilizados como corantes fluorescentes e

quimioluminescentes devido ao seu desvio de Stokes geralmente grande, pico de emissão estreito e longo comprimento de onda de emissão. Tipicamente, os quelatos metálicos consistem num complexo formado por um metal, como európio, samário, ou térbio, e ligandos, como tiofenotrifluorobutanodiona (TTA), naftiltrifluorobutanodiona (NTA), e 4,7-difenil-1,10-fenatrolina (DPP), óxido de trioctilfosfina (TOPO), óxido de trifenilfosfina (TPPO). Alguns quelatos metálicos habitualmente utilizados incluem $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$ e $\text{Eu}(\text{NTA})_3\text{DPP}$.

Transportadores corados que são utilizados para preparar reagentes de ensaios devem ter a capacidade para proporcionar geração de sinal, e a funcionalidade química de ligação covalente de ligandos. O processo utilizado para ligar os ligandos pode ser crítico para a qualidade da especificidade da funcionalidade de ligação de ligandos. A especificidade dos ligandos pode ser comprometida de vários modos por escolhas inapropriadas de química de ligação. Por exemplo, se adsorção passiva dos ligandos ocorrer simultaneamente com ligação covalente, os ligandos adsorvidos de modo passivo podem sair do transportador durante o ensaio. O ligando livre resultante irá interferir no ensaio e reduzir a sua sensibilidade. Outro problema que pode ocorrer é a ligação inespecífica do reagente ao outro transportador, o que conduz a aumento do sinal do imunoensaio na ausência de analito.

Os ligandos são muitas vezes ligados a partículas de poliestireno através de grupos carboxi que estão ligados diretamente à superfície das partículas. Esta abordagem pode ter os dois problemas descritos acima. Os problemas de adsorção passiva e ligação inespecífica podem ser evitados

introduzindo uma ou mais camadas de polímeros de hidrogel imobilizados, como um aminodextrano, entre as partículas de poliestireno e os ligandos. Para a eliminação da adsorção e ligação inespecífica é importante ter uma camada contínua destes polímeros de hidrogel.

No entanto, o revestimento de partículas que são coradas com corantes convencionais, como $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$ ou $\text{Eu}(\text{NTA})_3\text{DPP}$, origina tipicamente densidades do revestimento de aminodextrano que são significativamente menores do que o valor ótimo para prevenir a ligação inespecífica. A densidade de acoplamento do aminodextrano é tipicamente reduzida em 40-50%, relativamente ao seu valor máximo, quando estes corantes são adicionados ao nível ótimo para a resposta quimioluminescente do reagente. Níveis menores de corante originam composições que interferem menos no processo de revestimento de aminodextrano, mas reduzir o teor de corante também reduz a quimioluminescência necessária para um sinal forte.

Em conformidade, continua a ser necessário na área proporcionar um equilíbrio mais ótimo entre a amplitude do sinal de resposta e a especificidade dos componentes de geração de sinal num ensaio de ligação específica.

RESUMO DA INVENÇÃO

As composições da presente invenção proporcionam componentes de geração de sinal possuindo um equilíbrio ótimo entre a redução da ligação inespecífica, permitindo ao mesmo tempo um sinal de resposta melhorado.

De acordo com um aspeto da invenção é proporcionada uma composição adequada para utilização como componente de

geração de sinal num imunoensaio. A composição inclui um transportador possuindo um revestimento de um aminodextrano e corado com um quelato metálico. O quelato metálico está presente na quantidade de pelo menos 0,065 μM por miligrama de transportador, e a densidade média do revestimento de aminodextrano é pelo menos 45 μg por miligrama de transportador.

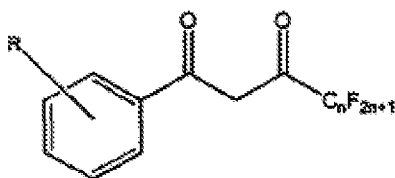
Uma composição de acordo com outro aspeto da invenção inclui um transportador revestido com um aminodextrano e com um complexo aí incorporado possuindo a fórmula:



em que M é um metal seleccionado do grupo que consiste em európio, térbio, disprósio, samário, ósmio e ruténio;

L1 é um ligando seleccionado do grupo que consiste em DPP, TOPO, e TPPO;

L2 compreende um ligando que tem a fórmula



Fórmula 1

em que R consiste num ou mais substituintes, em que cada substituinte compreende um grupo dador de eletrões; e $n = 2-10$; $x = 1-2$ e $y = 2-4$.

De acordo com outro aspeto da invenção, é proporcionado um método de deteção da presença ou quantidade de um analito numa amostra de teste suspeita de conter o analito. O método compreende realizar um imunoensaio utilizando as

composições da presente invenção como componente de geração de sinal.

As formas de realização presentemente preferidas, em conjunto com outros aspetos da invenção, serão melhor compreendidas com referência à seguinte descrição pormenorizada, tomada em conjunção com as figuras adjuntas.

DESCRIÇÃO BREVE DAS FIGURAS

A FIG. 1 é um diagrama esquemático que ilustra a síntese de uma forma de realização de um quelato metálico de acordo com a presente invenção.

A FIG. 2 é um diagrama esquemático que ilustra a síntese de outra forma de realização de um quelato metálico de acordo com a presente invenção.

A FIG. 3 é uma representação gráfica da concentração de aminodextrano e sinal de resposta como funções da concentração de metal para uma composição da técnica anterior.

A FIG. 4 é uma representação gráfica da concentração de aminodextrano e sinal de resposta como funções da concentração de metal para composições de acordo com a presente invenção.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

As composições da presente invenção são úteis como componentes de geração de sinal em imunoensaios. As composições incluem, em geral, um transportador revestido com um aminodextrano e têm um quelato metálico aí incorporado. As composições proporcionam sinais de resposta

fortes que permitem determinações quantitativas de analitos de interesse, ao mesmo tempo que reduzem erros causados por ligação inespecífica.

Transportadores adequados para a presente invenção incluem materiais em fase sólida, tipicamente um suporte ou superfície, que podem ter qualquer uma de algumas formas, como uma tira, folha, vareta, placa, cavidade, tubo, partícula ou esférula. Habitualmente, o material é um material insolúvel em água orgânico ou inorgânico, dilatável ou não dilatável, poroso ou não poroso, magnético ou não magnético. A superfície pode ser hidrófila ou apta a tornar-se hidrófila. O suporte sólido inclui pós inorgânicos, como sílica, sulfato de magnésio, e alumina; materiais poliméricos naturais, particularmente materiais celulósicos e materiais derivados de celulose, como papéis contendo fibras, por exemplo, papel de filtro, papel cromatográfico, etc.; polímeros sintéticos ou de ocorrência natural modificados, como nitrocelulose, acetato de celulose, cloreto de polivinilo, poliacrilamida, dextrano reticulado, agarose, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, tereftalato de polietileno, "nylon", butirato de polivinilo, etc.; utilizados por si próprios ou em conjunção com outros materiais; vidro disponibilizado como Bioglass, cerâmicas, materiais magnéticos, metais, e afins. Também podem ser empregues montagens naturais ou sintéticas, como lipossomas, vesículas fosfolipídicas, e células.

Numa forma de realização da presente invenção, o transportador é uma partícula. "Partícula", como usado aqui, abrange esferas, esferoides, esférulas e também

outras formas. Partículas adequadas têm, tipicamente, pelo menos 20 nm e não mais do que cerca de 20 μm , habitualmente pelo menos cerca de 40 nm e menos de 10 μm , preferivelmente 0,1 até 10 μm , mais preferivelmente 0,1 até 5 μm , e ainda mais preferivelmente 0,15 até 3 μm . A partícula pode ser orgânica ou inorgânica, dilatável ou não dilatável, porosa ou não porosa, possuindo qualquer densidade, mas preferivelmente com uma densidade aproximada à da água, em geral desde 0,7 até 1,5 g/mL, preferivelmente apta a ser suspensa em água, e composta por material que pode ser transparente, parcialmente transparente ou opaco. As partículas podem ser partículas núcleo-coroa, como partículas com um núcleo magnético e um revestimento de coroa dura de monómero(s) polimerizado(s). Preferivelmente, as partículas têm carga negativa. Preferivelmente, as partículas são sólidas, por exemplo, partículas poliméricas, sólidos metálicos (partículas compreendidas por um metal pesado, tal como, por exemplo, ouro ou prata), partículas de vidro, partículas de silício, partículas magnéticas, cristalitos de corante.

Uma partícula especialmente preferida é uma partícula de látex. "Látex", como usado aqui, significa um material polimérico em partículas insolúvel em água e apto a ser suspenso em água. O látex é frequentemente um polietileno substituído, tal como: poliestirenobutadieno, poliacrilamida poliestireno, poliestireno com grupos amino, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, acrilonitrilobutadieno, copolímeros de estireno, acetato-acrilato de polivinilo, polivinilpirridina, copolímeros de cloreto acrilato de vinilo, e afins. São preferidos polímeros não reticulados de estireno e estireno carboxilado ou estireno funcionalizado com outros grupos ativos, tais como amino,

hidroxilo, halo e afins. Frequentemente serão utilizados copolímeros de estirenos substituídos com dienos, como butadieno.

Os transportadores de acordo com a presente invenção são revestidos com uma ou duas camadas de um aminodextrano. Um aminodextrano é um polímero de glucose derivatizado com grupos amino possuindo um peso molecular de 10 000 até 2 000 000, preferivelmente 500 000. Métodos de preparação de aminodextranos e revestimento de transportadores são conhecidos na área. Métodos adequados são descritos em US 5,707,877, colunas 18-20, e US 5,639,620, colunas 21 e 22.

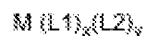
Num método preferido, aminodextrano é revestido sobre o transportador por ligação covalente do grupo amino do aminodextrano aos grupos carboxilo de superfície, ou outro grupo funcional do transportador reativo com aminas. Esse método é descrito em US-B-7,179,660 de atribuição comum, intitulado "Carriers Coated with Polysaccharides, Their Preparation and Use".

O revestimento de aminodextrano melhora a especificidade do transportador em ensaios de ligação específica e, em consequência, melhora a sensibilidade de imunoensaios. Foi descoberto que o quelato metálico da presente invenção permite, inesperadamente, o revestimento de transportadores com aminodextrano na quantidade de pelo menos cerca de 45 µg por miligrama de transportador na presença de uma concentração de corante tão elevada quanto pelo menos 0,065 µM. De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, o revestimento de aminodextrano está presente em pelo menos cerca de 49 µg por miligrama de transportador.

Numa forma de realização preferida da invenção, o transportador pode ser revestido com uma segunda camada compreendendo um polissacárido, como descrito em US-B-7,179,660. O polissacárido pode ser acoplado de modo covalente à camada de aminodextrano por grupos funcionais reativos com aminas. Numa forma de realização preferida, a segunda camada compreende dextrano aldeído.

Um quelato metálico é incorporado no transportador através de um processo conhecido, como coloração. O quelato metálico permite a detecção de um sinal fluorescente ou quimioluminescente. O quelato metálico é escolhido de modo que concentrações relativamente mais elevadas do quelato metálico não interfiram na ligação do revestimento de aminodextrano ao transportador. De acordo com uma forma de realização da presente invenção, o quelato metálico está presente na quantidade de pelo menos 0,065 μM por miligrama de transportador, ao passo que a densidade média do revestimento de aminodextrano é pelo menos 45 μg por miligrama de transportador. Noutra forma de realização da invenção, o quelato metálico está presente na quantidade de pelo menos 0,065 μM e menos de 0,150 μM por miligrama de transportador, mais preferivelmente 0,079 μM até 0,150 μM por miligrama de transportador, e mais preferivelmente cerca de 0,087 μM por miligrama de transportador. Noutra forma de realização da invenção, o quelato metálico está presente na quantidade de 0,110 μM até 135 μM . Verificou-se que estas concentrações de quelato metálico e aminodextrano proporcionam um equilíbrio apropriado de sinal de resposta e especificidade do componente para o analito de interesse.

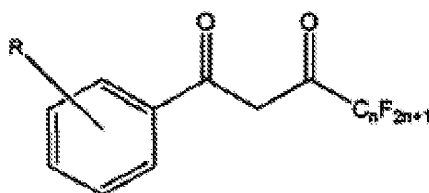
De acordo com uma forma de realização da presente invenção, o quelato metálico tem a fórmula geral



em que M é um metal selecionado do grupo que consiste em európio, térbio, disprósio, samário, ósmio e ruténio;

L1 é um ligando selecionado do grupo que consiste em DPP, TOPO, e TPPO;

L2 compreende um ligando que tem a fórmula



Fórmula 1

em que R consiste num ou mais substituintes, em que cada substituinte compreende um grupo dador de eletrões;

$n = 2-10$;

$x = 1-2$; e

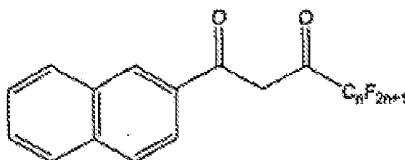
$y = 2-4$.

Grupos dadores de eletrões adequados são aqueles que disponibilizam carga negativa extra aos grupos perfluoralquilo. Numa forma de realização, o grupo dador de eletrões R é selecionado do grupo que consiste em C_1 até C_{10} alquilo, dialquilaminas, éteres, tioéteres, e grupos arilo.

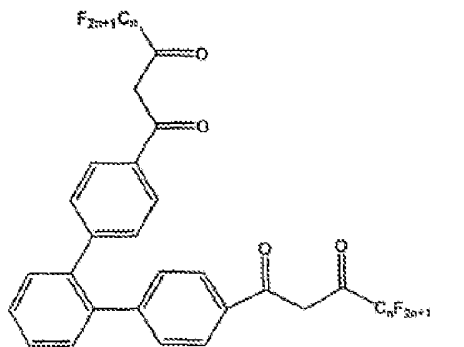
Sem pretender ficar restringido pela teoria, crê-se que os quelatos metálicos da presente invenção são eficazes na permissão de quantidades otimizadas de aminodextrano para

revestir o transportador porque os quelatos metálicos proporcionam um complexo inesperadamente estável relativamente a corantes de quelatos metálicos anteriores. A estabilidade do complexo reduz a quantidade do metal livre, que se crê inibir a ligação do aminodextrano ao transportador. Também se crê que grupos dadores de eletrões R aumentam ainda mais a estabilidade do complexo ao disponibilizarem carga negativa adicional aos grupos perfluoroalquilo dos ligandos, desse modo melhorando a capacidade do grupo perfluoroalquilo para se ligar ao metal no complexo.

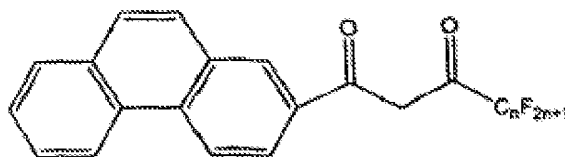
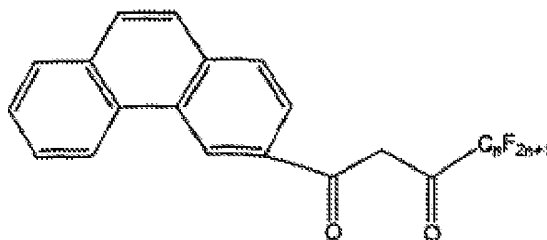
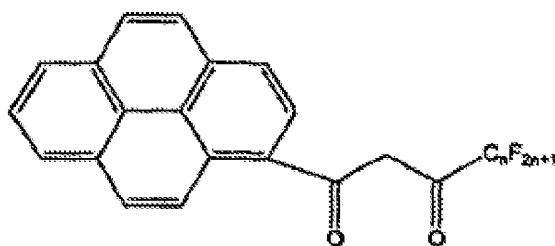
De acordo com uma forma de realização particular da invenção, M é európio e o transportador é uma partícula de látex. De acordo com formas de realização preferidas da invenção, $n = 3$ ou 7 , e $x = 1$ e $y = 3$. De acordo com formas de realização específicas da invenção, L2 é seleccionado de entre as fórmulas seguintes:



Fórmula 2



Fórmula 3

**Fórmula 4****Fórmula 5****Fórmula 6**

Numa forma de realização preferida dos ligandos acima descritos, $n = 3$ ou $n = 7$. Numa forma de realização preferida da invenção, os ligandos L2 são 2-(1',1',1',2',2',3',3'-heptafluoro-4',6'-hexanodion-6'-il)-naftileno (NHA) e 4,4'-bis(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-heptafluororo-4'',6''-hexanodion-6''-il)-o-terfenilo (BHHT).

Numa forma de realização particularmente preferida da presente, o quelato metálico compreende $\text{Eu}(\text{NHA})_3\text{DPP}$ e $\text{Eu}(\text{BHHT})_2\text{DPP}$. Em geral, os quelatos metálicos podem ser preparados combinando o cloreto metálico com a razão desejada de moléculas de ligando metálico num solvente orgânico e base suficiente para captar o ácido clorídrico

libertado. Sínteses adequadas são ilustradas nas FIGS. 1-2, respetivamente.

Verificou-se que os corantes de quelatos metálicos da presente invenção permitem uma densidade mais elevada de revestimento de aminodextrano a concentrações relativamente mais elevadas dos corantes de quelatos metálicos em comparação com corantes convencionais, como demonstrado nos Exemplos Comparativos em baixo. As concentrações de corantes otimizadas constantes, os quelatos metálicos da presente invenção permitirão, em geral, um revestimento de aminodextrano a 45 até 55 μg por mg de esférulas, em comparação com 23 até 35 μg por mg de esférulas para os corantes convencionais. Em conformidade, os corantes da presente invenção podem estar presentes em quantidades suficientes para originar sinais de resposta fortes como parte de um componente de geração de sinal num ensaio de ligação específica, ao mesmo tempo permitindo que o transportador seja revestido com um aminodextrano numa quantidade suficiente para reduzir a quantidade de ligação inespecífica.

As composições da presente invenção são adequadas para utilização como componente de geração de sinal em ensaios de ligação específica. As composições são adequadas para qualquer imunoensaio no qual é medido um sinal em resposta à ligação de ligandos a um analito. Os profissionais apreciarão facilmente que as composições têm grande utilidade nalguns formatos de ensaios.

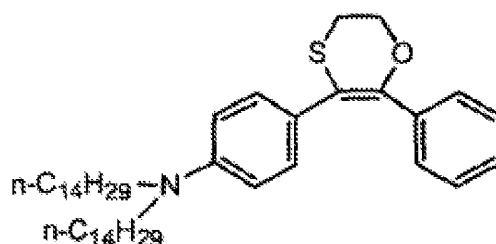
Numa forma de realização de um ensaio de ligação específica de acordo com a presente invenção, o componente de geração de sinal é utilizado para realizar o Imunoensaio de

Canalização de Oxigénio Luminescente (LOCI™), como descrito em EP-A2-0 515 194. Neste método para a determinação qualitativa ou quantitativa de um analito, pelo menos um parceiro de ligação específica é ligado a um transportador de acordo com a presente invenção. Um meio suspeito de conter um analito é tratado em condições tais que o analito afeta a quantidade de um sensibilizador capaz, no seu estado excitado, de gerar oxigénio singleto e um composto quimioluminescente que pode ficar muito próximo, de modo que o oxigénio singleto gerado por esse fotossensibilizador pode ativar esse composto quimioluminescente, que subsequentemente produz luz, e medindo a luz, em que a sua quantidade está relacionada com a quantidade de analito presente nesse meio.

Noutra forma de realização, o método LOCI™ inclui os passos seguintes: (A) combinar, de modo simultâneo ou total ou parcialmente sequencial, (i) um meio suspeito de conter o analito; (ii) um primeiro parceiro de ligação específica associado a um sensibilizador capaz, no seu estado excitado, de gerar oxigénio singleto; e (iii) um segundo parceiro de ligação específica associado a uma composição compreendendo um composto quimioluminescente, que é uma substância que sofre uma reação química com oxigénio singleto para formar uma espécie intermediária metaestável que pode decompor-se com emissão simultânea ou subsequente de luz; (B) permitir a formação de complexos compreendendo o primeiro e o segundo parceiros de ligação específica, em que a formação de complexos aproxima muito o sensibilizador do composto quimioluminescente, (C) ativar o sensibilizador para gerar oxigénio singleto; e medir a quantidade de luz emitida pelo composto quimioluminescente, em que a luz é direta ou inversamente proporcional à quantidade de analito

presente no meio. A composição compreendendo o composto quimioluminescente também pode compreender uma ou mais moléculas fluorescentes que são excitadas pelo composto quimioluminescente ativado. A luz emitida por essas moléculas fluorescentes pode ser medida para determinar a quantidade de analito presente no meio.

Numa forma de realização da invenção utilizando o método LOCI, o transportador pode ser corado com um quelato metálico e um aceitador de oxigénio. O aceitador de oxigénio é um componente que reage com oxigénio singlete para formar um produto altamente instável que rapidamente se decompõe num estado excitado. A energia em excesso do estado excitado é transferida para o corante por uma transferência de energia de Forster que ocorre num período de alguns nanossegundos. O corante de quelato metálico então emite um fóton de luz que pode ser detetado com um contador de fótons. Aceitadores de oxigénio adequados são divulgados nas patentes U.S. N°s 5,578,498 e 5,811,311. Um aceitador de oxigénio particularmente preferido é C-28 tioxeno, que tem a fórmula seguinte:



Fórmula 7

EXEMPLO: PREPARAÇÃO DE COMPONENTE DE GERAÇÃO ÚNICO

Uma mistura de 100 mL de solução a 10% de esférulas de látex carboxiladas (da Seradyn), 138 mL de 1-metoxi-2-propanol, 280 mL de água D.I. e 10 mL de 0,1 M NaOH é colocada num balão de três tubuladuras equipado com um

agitador mecânico e um termômetro. A mistura é conduzida para 80°C com agitação. É então preparada uma solução separada com 2 g de C-28 tioxi e 2,7 g de $\text{Eu}(\text{NHA})_3\text{DPP}$ em 220 mL de 1-metoxi-2-propanol, e a solução é aquecida para 80°C com agitação até à dissolução. A solução de corante é então derramada na solução de esférulas e é agitada durante 30 minutos a 80°C e depois é deixada arrefecer lentamente para 40°C. As esférulas são depois lavadas por diafiltração com 10% v/v etanol em água ajustado para pH 10 com NaOH. As esférulas são concentradas para cerca de 20 mg/mL durante a lavagem, e depois são armazenadas a 4°C protegidas da luz.

O revestimento de aminodextrano é então aplicado do modo seguinte. Um mililitro das esférulas coradas (~20 mg/mL) é misturado com 20 mg/mL de hidroxipropilaminodextrano (PM 500 K) em 0,05 M MES/pH 6,0 na presença de 3,8 mg/mL de EDAC. Após incubação desta mistura durante 16 horas à temperatura ambiente, (no escuro) as esférulas foram lavadas uma vez com 2 mL de 0,05 M MES/pH 6,0, depois com 6 mL de 0,05 M MES, 1,0 M NaCl/pH 6,0. Por fim, as esférulas foram ressuspensas em 1 mL de 0,05 M MES/pH 6,0 para dar origem às esférulas revestidas. Efetuou-se lavagem pelo método de centrifugação (utilizando uma centrífuga Sorval RC-5B Plus ou centrífuga Ependorf 5415 C) e os grânulos foram ressuspensos por sonicação (utilizando Branson Sonifer-450).

A camada de dextrano aldeído pode ser adicionada do modo seguinte. Um mililitro de 20 mg/mL de dextrano aldeído em 0,05 M MES é misturado com 1 mL das esférulas quimioluminescentes revestidas com aminodextrano na presença de 2 mg/mL de NaBH_3CN . Após incubação a 37°C durante 20 horas (no escuro), as esférulas foram lavadas

uma vez com 4 mL e depois com mais 5 mL de tampão MES. As esférulas foram ressuspensas em 0,5 mL de 0,05 MES, 0,4% Tween-20/pH 6,0, dando origem a cerca de 40 mg/mL de esférulas revestidas.

EXEMPLO COMPARATIVO 1

Um primeiro conjunto de partículas de látex foi corado com $\text{Eu(NTA)}_3\text{DPP}$ e tioxeno e foi revestido com um aminodextrano de acordo com os métodos descritos aqui. De igual modo, um segundo conjunto de partículas de látex foi corado com $\text{Eu(NHA)}_3\text{DPP}$ e tioxeno e foi revestido com um aminodextrano.

Para cada uma das composições, as densidades do revestimento de aminodextrano e a quimioluminescência foram simultaneamente medidas a várias concentrações do quelato metálico. A densidade do revestimento de aminodextrano foi medida por um teste colorimétrico depois de ter sido tratado com antrona e 80% ácido sulfúrico. A quimioluminescência foi medida na forma de contagens LOCI por um leitor Envision-Alpha vendido pela Perkin-Elmer. Os dados para $\text{Eu(NTA)}_3\text{DPP}$ estão tabulados na Tabela 1 e mostrados graficamente com ajustamento da curva na FIG. 3. Os dados para $\text{Eu(NHA)}_3\text{DPP}$ estão tabulados na Tabela 2 e, para concentrações até 0,094, estão mostrados graficamente com ajustamento da curva na FIG. 4.

Tabela 1: Contagens LOCI e concentração de aminodextrano em função da concentração de európio em $\text{Eu(NTA)}_3\text{DPP}$

Eu (mMole/g esférulas)	Revestimento de aminodextrano (ug/mg esférulas)	Sinal LOCI, contagens MM
0,169	30	9,7
0,085	36	9,2
0,042	45	6,7
0,021	55	2,8
0,000	62	0,0

Tabela 2: Contagens LOCI e concentração de aminodextrano em função da concentração de európio em $\text{Eu}(\text{BHHT})_2\text{DPP}$

Eu (mMole/g esférulas)	Revestimento de andex (ug/mg esférulas)	Sinal LOCI, contagens MM
0,020	3,8	60
0,028	5,3	57
0,035	6,6	55
0,043	7,7	53
0,050	8,6	51
0,057	9,4	50
0,065	10,0	49
0,072	10,5	49
0,079	10,8	49
0,087	10,9	50
0,094	10,8	50
0,0135*	10,8*	50*
* resultados não mostrados na FIG. 4		

Como pode ser observado na FIG. 3, na composição da técnica anterior, a carga de aminodextrano e o sinal de LOCI não ficaram simultaneamente posicionados num patamar da resposta relativamente à composição. O sinal de resposta não começa a aplanar até cerca de 0,085 mmol Eu/grama de esférulas. A concentrações mais elevadas, a concentração do revestimento de aminodextrano é apenas 36 ug/mg de esférulas, e continua a diminuir com concentrações crescentes de európio.

Em contraste, como mostrado na FIG. 4, o composto de acordo com a presente invenção começa a aplanar, em termos da concentração de aminodextrano e sinal de LOCI, com somente 0,065 mmol Eu/grama de esférulas. A esta concentração, a concentração média do revestimento de aminodextrano é 49 ug/mg de esférulas. Além disso, a concentração de aminodextrano permanece geralmente estacionária com o aumento da concentração de európio.

EXEMPLO COMPARATIVO 2

Esférulas de látex da Seradyn foram coradas com 0,171 mmol de corante de Európio e 0,303 mmol de C-28 tioxiato por grama de esférulas para cada um de dois corantes convencionais, $\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$ e $\text{Eu}(\text{NTA})_3\text{DPP}$, e dois corantes de acordo com a presente invenção, $\text{Eu}(\text{BHHT})_2\text{DPP}$ e $\text{Eu}(\text{NHA})_3\text{DPP}$. As esférulas foram depois revestidas com aminodextrano como descrito aqui. Determinaram-se as densidades do aminodextrano, bem como a amplitude do seu sinal de resposta. Os dados estão tabulados na Tabela 3.

Todos os componentes de geração de sinal proporcionaram um sinal adequado, medido por contagens LOCI. No entanto, os corantes da presente invenção originaram um intervalo significativamente maior de densidades de revestimento de aminodextrano.

Tabela 3: Partículas Coradas com Complexo de Európio
Densidade de Revestimento de Aminodextrano

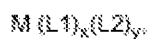
Tipo de Corante	Densidades de revestimento de aminodextrano ($\mu\text{g}/\text{mg}$ esférulas)	Contagens LOCI (MM)
$\text{Eu}(\text{TTA})_3\text{DPP}$	21-44	8,4-13,3
$\text{Eu}(\text{NTA})_3\text{DPP}$	30-47	6,8-9,6
$\text{Eu}(\text{BHHT})_2\text{DPP}$	63-69	9,9-10,3
$\text{Eu}(\text{NHA})_3\text{DPP}$	48-60	5,9-9,1

Lisboa, 18 de Setembro de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Composição adequada para utilização como componente de geração de sinal num imunoensaio, que compreende:

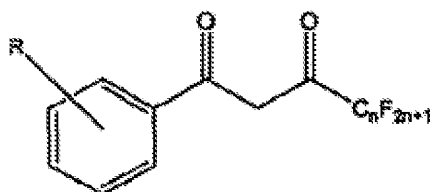
um transportador revestido com um aminodextrano, em que a densidade média do revestimento de aminodextrano é pelo menos 45 µg por miligrama de transportador, e tendo aí incorporado, a uma concentração de pelo menos 0,065 mMole por grama de transportador, um complexo possuindo a fórmula:



em que M é um metal selecionado do grupo que consiste em európio, térbio, disprósio, samário, ósmio e ruténio;

L1 é um ligando selecionado do grupo que consiste em DPP, TOPO, TPPO;

L2 compreende um ligando que tem a fórmula



Fórmula 1

em que R consiste num ou mais substituintes, em que cada substituinte compreende um grupo dador de eletrões;

n = 2-10;

x = 1-2; e

y = 2-4.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que cada R é independentemente selecionado do grupo que

consiste em C_1 até C_6 alquilos, dialquilaminas, éteres, tioéteres, e arilos.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que cada M compreende európio.

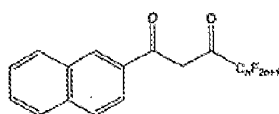
4. Composição de acordo com a reivindicação 3, em que o transportador compreende uma partícula de látex.

5. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que $n = 3$.

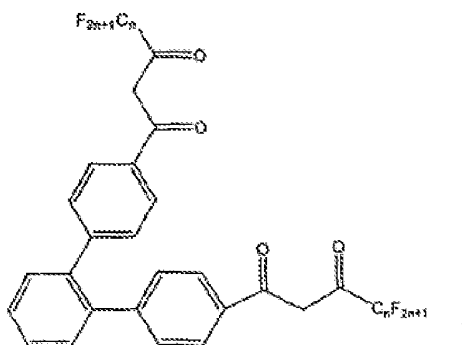
6. Composição de acordo com a reivindicação 2, em que $x = 1$ e $y = 3$.

7. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que $n = 7$.

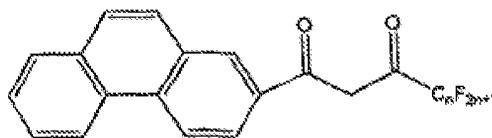
8. Composição de acordo com uma das reivindicações 1 até 7, em que L2 compreende um ligando selecionado do grupo que consiste em:



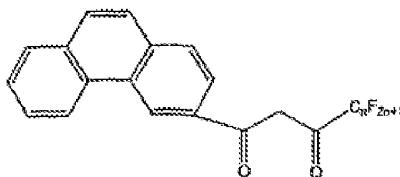
Fórmula 2



Fórmula 3

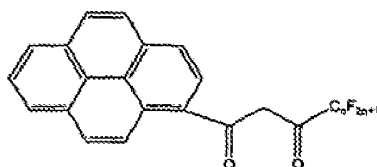


Fórmula 4



Fórmula 5

e



Fórmula 6

9. Composição de acordo com uma das reivindicações 1 até 8, em que o revestimento também compreende uma segunda camada compreendendo um dextrano aldeído.

10. Composição de acordo com uma das reivindicações 1 até 9, em que o transportador também compreende um aceitador de oxigénio.

11. Método para detetar a presença ou quantidade de um analito numa amostra de teste suspeita de conter o analito, em que o método compreende:

realizar um imunoensaio utilizando a composição de acordo com a reivindicação 1 como componente de geração de sinal.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o imunoensaio compreende o imunoensaio de canalização de oxigénio luminescente.

13. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o complexo está presente na quantidade de 0,065 mMole por grama até 0,150 mMole por grama de transportador.

Lisboa, 18 de Setembro de 2012

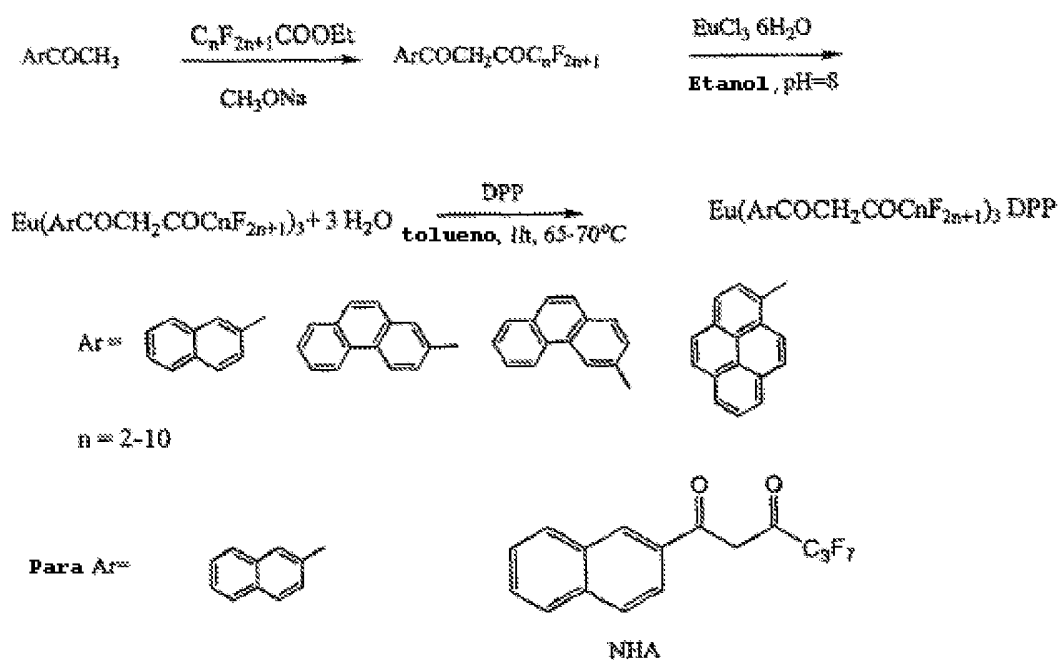


FIG. 1

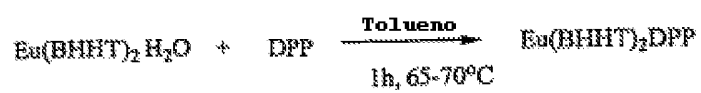
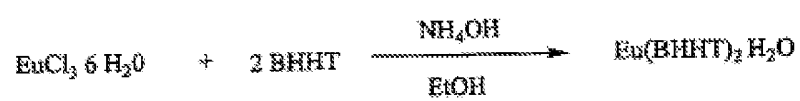
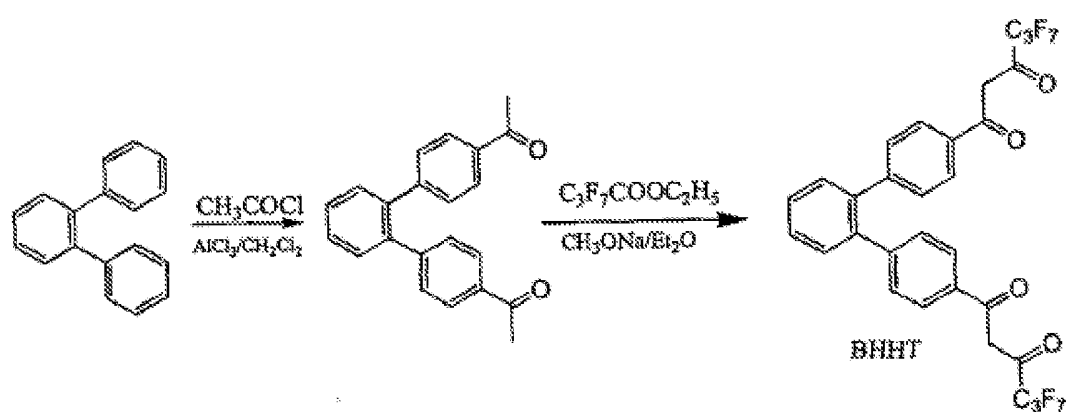


FIG. 2

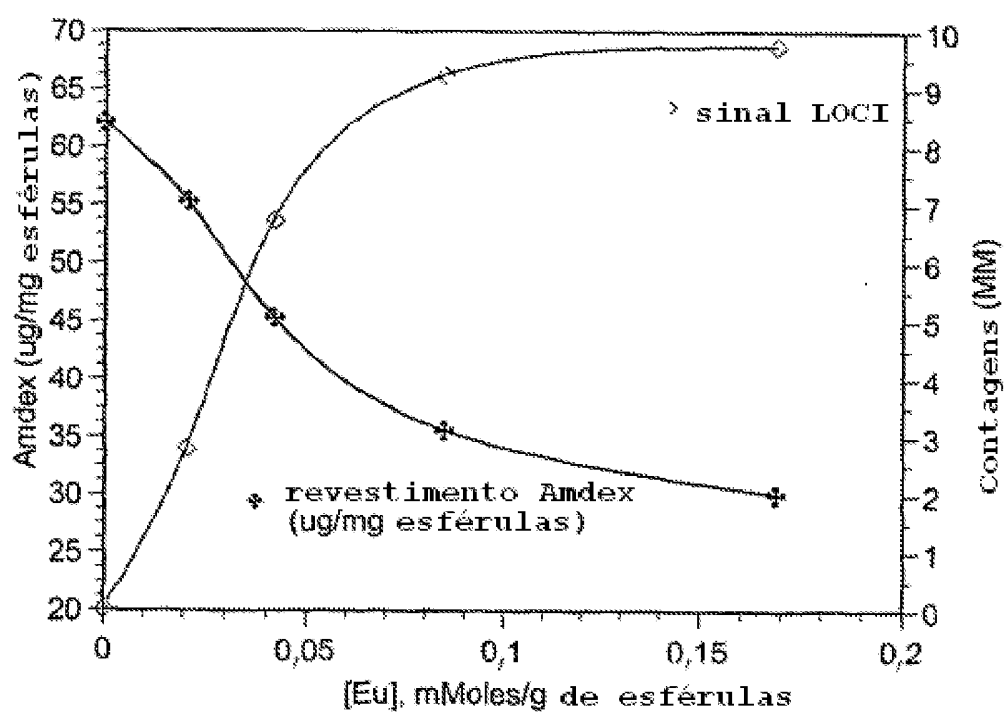
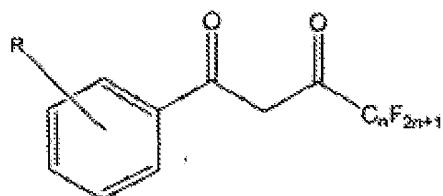


FIG. 3 (TÉCNICA ANTERIOR)



Fórmula 1

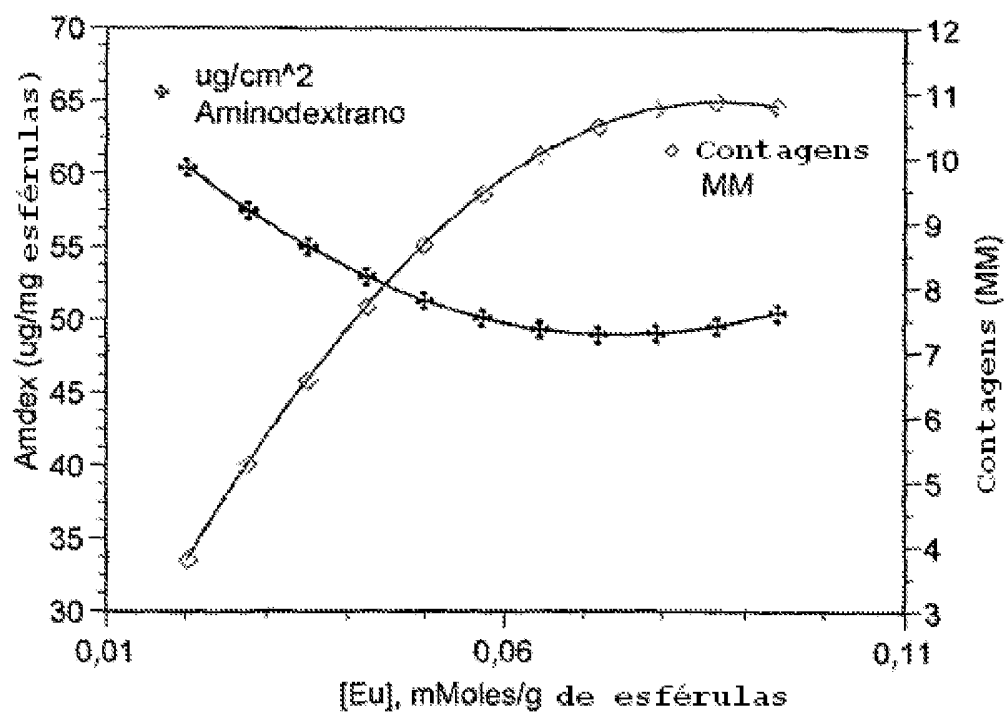


FIG. 4